

LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE LA PROTÉINE KINASE ZPK ET  
IDENTIFICATION DE L'UN DE SES PARTENAIRES PROTÉIQUES

par

Mélanie Douziech, B.Sc.

mémoire présenté au Département de biologie en vue  
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, Mai 1999



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-56898-9

Canada

Le 16 juin 99, le jury suivant a accepté ce mémoire dans sa version finale.  
date

Président-rapporteur: M. Benoit Coulombe  
Département de biologie

\_\_\_\_\_

Membre: M. Claude Déry  
Département de biologie

\_\_\_\_\_

Membre: M. Richard Blouin  
Département de biologie

\_\_\_\_\_

À mes Parents et mes Grands-Parents,  
un amour sincère et véritable gravé à  
jamais sur cette page.

## SOMMAIRE

La protéine ZPK est une sérine/thréonine kinase membre de la famille des "mixed-lineage kinases" (MLKs) dont la fonction est vraisemblablement associée à la régulation des processus de prolifération et de différenciation cellulaire. Dans le but d'obtenir des indices supplémentaires relativement à son rôle physiologique, l'étude de sa localisation subcellulaire a été effectuée. Ainsi, nous avons dans un premier temps, localisé la protéine kinase ZPK endogène dans les cellules NIH 3T3 au niveau de l'appareil de Golgi, suggérant alors son implication possible dans la modulation des diverses fonctions caractéristiques de cet organelle.

ZPK comporte au sein de sa séquence primaire de nombreux motifs susceptibles de médier, au cours de la transduction des signaux, des interactions protéine-protéine dans le but d'assurer la propagation de l'information en direction du noyau et par le fait même d'exercer ses fonctions à travers les différents processus cellulaires. Pour vérifier d'une part, son association au niveau de l'appareil de Golgi et d'autre part, sa capacité à médier des interactions protéiques, une protéine de fusion bactérienne correspondant à l'une des régions riches en prolines de la protéine kinase ZPK a été produite. Des extraits membranaires de cellules NIH 3T3 ont été transférées sur membrane de PVDF pour être ensuite incubés avec cette sonde protéique, le contrôle négatif étant l'utilisation de la sonde GST. Une protéine d'environ 30 kDa (P30) ayant interagit spécifiquement avec la portion proline riche de ZPK a été identifiée. Cette dernière a ensuite été purifiée par chromatographie d'affinité grâce à l'utilisation d'une matrice de glutathione sépharose complexée à la protéine de fusion ZPK. L'identification de ce partenaire n'a cependant pu être effectuée puisque le spectre de masse a révélé qu'il s'agissait d'une protéine inconnue à ce jour.

## REMERCIEMENTS

Je voudrais en premier lieu remercier sincèrement mon directeur, le Dr. Richard Blouin, qui m'a permis de réaliser avec succès mes travaux de recherche grâce à sa disponibilité, ses conseils judicieux ainsi que la marque de confiance qu'il m'a attribué au départ. Je voudrais remercier mes conseillers, les Drs. Benoît Coulombe et Claude Déry, pour m'avoir appuyé tout au long de ma maîtrise sous un encadrement très enrichissant. J'aimerais de plus remercier Gilles Grondin non seulement pour m'avoir appris les rudiments de la microscopie, mais également pour avoir été continuellement disponible. Ses conseils ont été grandement appréciés.

J'aimerais également souligner l'importance de mes parents, de mes grands-parents, de ma grande soeur, de mon frère jumeau, de Stéphane et de ma belle famille, des gens aussi extraordinaires que précieux à mes yeux, qui ont su m'encouragé à chaque instant. Merci du plus profond de mon coeur.

Finalement un dernier mot, mais non le moindre, revient à mon conjoint et collègue de travail, Gino Laberge, qui m'a témoigné tout au long de ma maîtrise une très grande complicité. Sa tendresse et son sens de l'humour ont su égayer mes journées moins ensoleillées. Sans toi rien n'aurait été pareil!

Ce travail a été généreusement supporté par le programme de Bourses d'études supérieures ÉS A du Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG).

## TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	ii
REMERCIEMENTS .....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	vii
LISTE DES TABLEAUX .....	x
LISTE DE FIGURES .....	xi
INTRODUCTION.....	1
Signalisation induite par des récepteurs à activité tyrosine kinase.....	5
Signalisation induite par des récepteurs à cytokines .....	9
Signalisation induite par des récepteurs couplés à des protéines G.....	13
Domaines d'interaction impliqués dans la signalisation.....	17
Domaines SH2/SH3.....	18
Domaines WW/WWP.....	22
Domaines PH.....	23
Cascade des MAPKs .....	24
La famille des MLKs.....	35
ZPK/DLK/MUK.....	37
Description du projet de Maîtrise .....	40
CHAPITRE 1 - MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	42
1.1 Détermination de la localisation subcellulaire de la protéine ZPK .....	42
1.1.1 Culture cellulaire .....	42
1.1.2 Immunohistochimie.....	42
1.1.3 Fractionnement subcellulaire.....	43
1.1.4 Immunobuvardage .....	44
1.1.5 Extraction membranaire.....	45

1.1.6	Traitement à la trypsine de membranes intactes ou perméabilisées au Triton .....	46
1.2	Préparation de l'ADN recombinant .....	47
1.2.1	Amplication, purification et clonage de la région riche en prolines de ZPK murin. .... par PCR.....	47
1.2.2	Cellules compétentes et transformation cellulaire.....	49
1.2.3	Minipréparation de l'ADN plasmidique par lyse alcaline.....	50
1.2.4	Détermination de la séquence.....	50
1.3	Purification de la protéine de fusion GST-RRP1 .....	50
1.3.1	Détermination du meilleur clone pGEX 2TK recombinant.....	50
1.3.2	Analyse sur gel de polyacrylamide.....	52
1.3.3	Préparation de la colonne de glutathione sépharose 4B .....	52
1.3.4	Purification du GST et de la protéine du fusion GST-RRP1 .....	53
1.3.5	Régénération de la matrice .....	54
1.4	Purification du partenaire protéique de ZPK.....	55
1.4.1	Préparation des extraits cellulaires nécessaires à la purification d'un..... partenaire protéique de ZPK.....	55
1.4.2	Purification d'un partenaire potentiel capable d'interagir avec ZPK .....	56
1.4.3	Far Western.....	57
CHAPITRE 2 - RÉSULTATS.....		58
2.1	Localisation subcellulaire de ZPK dans les cellules NIH 3T3 .....	58
2.2	Copurification de ZPK avec l'appareil de Golgi par fractionnement subcellulaire .....	61
2.3	Association de ZPK aux membranes du Golgi et disposition topologique .....	64
2.4	Construction du vecteur d'expression pGEX 2TK recombinant.....	66
2.5	Purification du GST et de la protéine de fusion GST-RRP1 .....	69
2.6	Purification d'un partenaire protéique de ZPK par chromatographie d'affinité.....	72
CHAPITRE 3 - DISCUSSION.....		76
3.1	La protéine kinase ZPK est localisée au niveau de l'appareil de Golgi .....	77
3.2	ZPK et son association aux membranes de l'appareil de Golgi .....	78



3.3	Identification d'un partenaire protéique de ZPK.....	80
3.4	Mode d'action hypothétique de la protéine kinase ZPK .....	81
3.5	Perspectives relatives à cette découverte.....	82
3.6	ZPK et la biogénèse et/ou le transport des vésicules? .....	83
3.7	Perspectives relatives à l'implication de ZPK dans la modulation des fonctions du.....	
	Golgi.....	84
	CONCLUSION .....	87
	ANNEXE 1 .....	89
	BIBLIOGRAPHIE.....	90

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

### unités de mesure

g	force gravitationnelle
g	gramme
kDa	kilodalton
L	litre
mA	milliampère
ml	millilitre
M	molaire
mm	millimètre
mM	millimolaire
ng	nanogramme
nm	nanomètre
pb	paire de bases
rpm	révolutions par minute
U	unité
µg	microgramme
µl	microlitre
v/v	volume/volume
w/v	poids/volume

### autres

A	adénine
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	acide ribonucléique

ARNm	ARN messenger
ATP	adénosine triphosphate
BFA	bréfeldine A
C	cytosine
DLK	"Dual leucine-zipper bearing kinase"
DMEM	"Dulbecco's Modified Eagles Medium"
DO	densité optique
DTT	dithiothreitol
FBS	"Fetal Bovine Serum"
G	guanine
GDP	guanosine diphosphate
GST	glutathione S-transférase
GTP	guanosine triphosphate
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
ISGF3- $\alpha$	"Interferon-stimulated-gene factor 3- $\alpha$ "
JIP-1	" <i>JNK</i> interacting protein-1"
LMP	"Low-melting point temperature"
Man II	$\alpha$ -mannosidase II
MLKs	"Mixed-lineage kinases"
MP-1	"MEK partner -1"
MUK	"MAPK-upstream kinase"
NBT	sel de nitrobleu tetrazolium
oligo	oligonucléotide
PCR	polymérisation en cascade
PMSF	phénylméthylsulfonyle fluorure
PVDF	"poly-vinylidene-difluorure"
RRP	région riche en prolines
SDS	dodécyl sulfate de sodium
SDS-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS

SH2	" <i>src</i> homology domain 2"
SH3	" <i>src</i> homology domain 3"
T	thymine
x-phosphate	sel de toluinium, 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
ZPK	protéine "Zipper Protein Kinase"
ZPK	gène "Zipper Protein Kinase"

## **LISTE DES TABLEAUX**

1. Les acides aminés et leur symbole.....	89
---	----

## LISTE DE FIGURES

### INTRODUCTION

Figure 1. Représentation schématique de la structure tridimensionnelle du domaine catalytique de la PKA.....	5
Figure 2. Initiation du processus de signalisation par un récepteur à tyrosine kinase (PDGF) .....	8
Figure 3 . Activation de la protéine Ras par le récepteur à EGF.....	10
Figure 4 . Modèle relatant l'implication des récepteurs à cytokines dans la transmission de l'information vers le noyau. ....	12
Figure 5. Modèle évoquant la transduction des signaux par l'intermédiaire des récepteurs à cytokines.....	13
Figure 6. Représentation schématique d'un récepteur couplé à une protéine G hétérotrimérique.....	15
Figure 7. Modèle explicatif du mode d'activation des protéines G.....	16
Figure 8. Mécanisme d'activation des molécules caractérisées par des domaines SH2/SH3 via des récepteurs à facteurs de croissance.....	21
Figure 9. Cascade des MAPKs chez les mammifères. ....	26
Figure 10. La voie des ERKs.....	27
Figure 11. La voie des JNKs .....	28
Figure 12. La voie de p38.....	29
Figure 13. Modèle établissant les rôles de la voie des JNKs et des ERKs dans l'induction du processus d'apoptose.....	32
Figure 14. Complexes multiprotéiques chez la levure.....	33

Figure 15. Complexes multiprotéiques chez les mammifères .....	35
Figure 16: Représentation schématique de la séquence primaire de ZPK.....	37

## RÉSULTATS

### Localisation de ZPK au Golgi

Figure 17. Localisation immunocytochimique de ZPK endogène dans les cellules NIH 3T3 .....	59
Figure 18. Effet de la Bréfeldine A (BFA) sur la distribution de ZPK endogène .....	60
Figure 19. Analyse par microscopie électronique de la localisation subcellulaire de ZPK .....	62
dans les NIH 3T3 .....	62
Figure 20. Distribution subcellulaire de ZPK.....	63
Figure 21. Association de ZPK aux membranes du Golgi et disposition topologique.....	65

### Identification et purification d'un partenaire de ZPK

Figure 22. Construction du vecteur d'expression recombinant pGEX 2TK RRP1 .....	67
Figure 23. Séquence correspondant à la région riche en prolines de la protéine ZPK ayant .....	68
été amplifiée par PCR au moyen d'oligonucléotides spécifiques. ....	68
Figure 24. Gel de séquence du vecteur d'expression recombinant pGEX 2TK-RRP1.....	70
Figure 25. Étapes de la purification du GST et de la protéine de fusion GST-RRP1 .....	71
Figure 26. Identification d'un partenaire protéique capable d'interagir avec la région riche .....	73
en prolines de ZPK. ....	73
Figure 27. Spectre de masse de la protéine P30 d'environ 30 kDa purifiée par .....	75
chromatographie d'affinité.....	75

## INTRODUCTION

Les cellules des organismes multicellulaires doivent constamment être en communication les unes avec les autres non seulement pour assurer la coordination de leur croissance et de leur différenciation, mais aussi pour maintenir l'homéostasie interne suite à des stimulations générées par des changements environnementaux (Heldin et Purton, 1996). Ces organismes ont élaboré différents réseaux de communication intercellulaires dont l'établissement est caractérisé soit par des contacts directs entre les cellules (jonctions communicantes, jonctions adhérentes, jonctions serrées), soit par la sécrétion extracellulaire de molécules solubles (Darnell *et al.*, 1993). Ces dernières molécules, synthétisées puis libérées par une cellule émettrice, servent de signaux capables de déclencher une réponse spécifique résultant de leur association à un récepteur particulier localisé au niveau de la membrane plasmique d'une cellule cible. Cette interaction aura pour effet l'induction de la transmission de ce signal de la surface cellulaire jusqu'au noyau, par l'intermédiaire de médiateurs protéiques importants, pour y réguler l'expression de certains gènes. Cette régulation se traduit alors par une multitude de processus physiologiques regroupant, entre autres, la prolifération, la différenciation cellulaire, la régulation du cycle cellulaire, l'inhibition de la croissance et l'apoptose. Ces processus, aussi variés soient-ils, doivent constamment être en équilibre les uns avec les autres afin d'assurer la cohérence et l'harmonie qui subsistent à travers les différentes populations de cellules composant un organisme pluricellulaire. Mais encore faut-il que chaque sous-population de cellules, indépendamment de sa localisation, soit apte à percevoir tout changement encouru au sein de l'organisme. D'où la nécessité d'établir différents réseaux de communication intercellulaires.

Des études se rapportant à l'oncogénèse, ont démontré l'importance de la régulation négative de la croissance dans le maintien de l'homéostasie, puisqu'elle préviendrait



l'anarchie cellulaire et par le fait même la déstabilisation de cet équilibre précaire. Cette régulation négative se traduit soit par la différenciation cellulaire, soit par l'inhibition de la croissance ou par l'apoptose. En effet, la différenciation cellulaire est un phénomène au cours duquel certaines cellules ou populations de cellules acquièrent une spécialisation particulière suivant l'expression ou l'inhibition de l'expression de gènes caractéristiques. Cette spécialisation s'accompagne généralement d'une perte de la capacité à proliférer et donc constitue une forme de régulation négative de la croissance. Il existe en fait deux processus cellulaires étroitement reliés suivant l'induction de la différenciation. Le premier constitue le cheminement d'une cellule à travers les différents stades successifs du processus alors que le second correspond à l'inhibition de la croissance. Cette inhibition offre comme point culminant chez certaines lignées cellulaires, l'apoptose, communément appelé mort cellulaire programmée (Liebermann *et al.*, 1995). L'exemple classique faisant état de cette distinction est illustré par les cellules appartenant aux différentes couches épithéliales qui tapissent la surface des cavités de l'organisme tel que l'intestin. En effet, les cellules localisées au niveau de la crypte donnent naissance à de nombreuses cellules filles qui entameront une lente progression en direction des villosités et au cours de laquelle elles se spécialiseront (acquisition d'enzymes qui permettent la digestion des aliments et leur absorption). Arrivée au niveau des villosités, chaque cellule spécialisée est maintenant différenciée de façon terminale, ce qui signifie en partie qu'elle perd sa capacité à proliférer. Dès lors, l'issue de ces cellules est caractérisée par une dégradation cellulaire autolytique ou mort cellulaire programmée, dont la résultante est d'occasionner leur détachement au bout de la villosité. Ainsi, tous ces mécanismes servant à réguler le taux de croissance permet d'éviter toute déstabilisation de l'organisme. Il s'agit d'une intégration complexe nécessitant l'intervention de plusieurs effecteurs. Comme nous l'avons mentionné, ces effecteurs sont des médiateurs protéiques localisés tant au niveau de la membrane plasmique qu'au niveau du cytoplasme. Ils regroupent, entre autres, différentes protéines kinases (PKs) capables d'ajouter spécifiquement des groupements phosphates sur des acides aminés particuliers. En effet, ces principaux sites de phosphorylation consistent en des groupements alcooliques de résidus sérine et thréonine de même qu'en des groupements phénoliques de résidus tyrosine (Dhanasekaran et Reddy, 1998). Cette distinction quant au site de phosphorylation a permis à

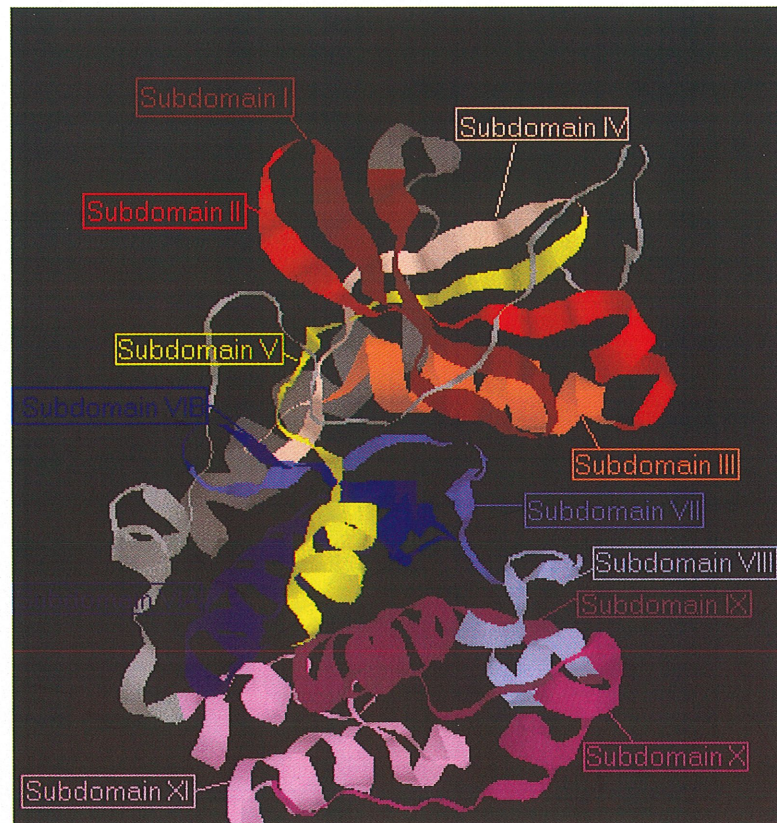
la communauté scientifique de classifier tous les membres de cette famille en trois sous-groupes : les sérine/thréonine kinases (PSKs) capables de phosphoryler les résidus sérine et/ou thréonine, les tyrosine kinases (PYKs) phosphorylant uniquement les résidus tyrosine et les kinases à double spécificité (DSKs) capables de phosphoryler les résidus sérine et/ou thréonine de même que les résidus tyrosine (Douville *et al.*, 1994; Dhanasekaran et Reddy, 1998). Or, par quel mécanisme ces nombreuses protéines aussi variées soient-elles, peuvent assurer la spécificité de la réaction ? En d'autres termes, comment la protéine peut-elle discriminer entre les résidus sérine et/ou thréonine et les résidus tyrosine ? En fait, l'avènement de la cristallographie a favorisé la compréhension de ce mécanisme d'action. En effet, il a été démontré que les tyrosine kinases induisaient la formation d'une "poche catalytique" à l'intérieur de laquelle le résidu hydroxyl accepteur, en l'occurrence celui de la tyrosine, vient s'y positionner, ce qui favoriserait le phosphotransfert. Les résidus sérine/thréonine par contre, ne pourraient être phosphorylés par une tyrosine kinase puisque leur groupement hydroxyl susceptible d'accepter le phosphate est directement relié au carbone  $\beta$  et non à un groupement phénolique de sorte qu'il ne pourrait pénétrer assez profondément à l'intérieur la poche catalytique. La question demeure cependant en ce qui concerne les kinases à double spécificité. Une étude réalisée avec la protéine kinase ERK, une MAPK, semble suggérer l'adoption d'un ordre de fixation précis qui permettrait de rendre compte cette double spécificité (Marshall, 1994 ; Taylor *et al.*, 1995). En effet, il a été montré que la tyrosine était le seul résidu phosphorylé et ce même si la concentration d'ATP était limitante. Néanmoins, la phosphorylation du résidu thréonine par MEK 1 (MAPKK) ne nécessite en aucun cas qu'il y est à priori la phosphorylation de la tyrosine. Certains mutants caractérisés par le changement du résidu tyrosine en un autre acide aminé, voient vraisemblablement leur thréonine phosphorylée par cette MAPKK (Marshall, 1994).

Malgré le fait qu'il existe au sein de la famille des protéines kinases une très grande diversité tant au niveau des structures, des modes de régulation et de la spécificité des substrats, nous avons mentionné précédemment que les membres de ces trois sous-groupes

appartiennent à la même famille de protéines kinases en vertu de leur domaine catalytique, mieux connu sous le nom de domaine kinase (domaine SH1) (Hanks *et al.*, 1988; Hanks et Hunter, 1995; Schwartzberg, 1998). En effet, ce domaine constitué d'environ 250-300 acides aminés (30 kDa) est organisé en 12 sous-domaines conservés (Hanks *et al.*, 1988; Hanks et Hunter, 1995) et caractérisé par une structure tridimensionnelle bien établie (Figure 1). Chacun de ces sous-domaines est caractérisé par la présence de résidus hautement essentiels impliqués d'une part dans la structuration de l'enzyme et d'autre part dans l'établissement de sa fonction (Johnson *et al.*, 1996). En général, les rôles attribuables au domaine catalytique sont à la fois la fixation et l'orientation de l'ATP (ou GTP) et de la protéine substrat de façon à favoriser le transfert du  $\gamma$ -phosphate sur le résidu hydroxyl accepteur (Ser, Thr ou Tyr) de cette même protéine substrat (Hanks et Hunter, 1995). Ce transfert nécessite, à prime abord, l'activation par phosphorylation d'un ou des résidu(s) localisé(s) au coeur même du domaine kinase de l'enzyme (segment d'activation). Cette activation implique un changement conformationnel conduisant à la disposition optimale des groupements catalytiques ce qui permet alors l'accès de la molécule substrat au site catalytique (Johnson *et al.*, 1996).

Nous avons déjà mentionné que la cellule est continuellement soumise à divers agents extracellulaires présents dans l'environnement qui entraînent inévitablement l'initiation du processus de transduction des signaux. Ces agents qui regroupent, entre autres, les facteurs de croissance, les hormones, ainsi qu'une variété de cytokines, occasionnent ces inductions grâce à leur capacité de s'associer à un récepteur spécifique localisé au niveau de la membrane plasmique. Cette association permet ainsi de réguler les différents processus cellulaires qui régissent les organismes multicellulaires, tels que la prolifération et la différenciation. En effet, ces récepteurs dictent, d'une certaine façon, la voie à suivre pour répondre adéquatement aux divers agents extracellulaires et sont en général, les premiers acteurs dans la transmission du signal en direction du noyau. Une simple mutation chez l'un de ces récepteurs peut occasionner des effets catastrophiques en raison du fait que la cellule devient

en partie coupée de son environnement extérieur et donc n'est plus en mesure de répondre adéquatement.



**Figure 1. Représentation schématique de la structure tridimensionnelle du domaine catalytique de la PKA.** Celui-ci est caractérisé par la présence de 12 sous-domaines conservés.

### **Signalisation induite par des récepteurs à activité tyrosine kinase**

La famille des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs) comporte plus de 50 polypeptides transmembranaires tous caractérisés par un domaine tyrosine kinase localisé dans la portion intracellulaire. Ces membres sont subdivisés en 14 sous-groupes basés sur

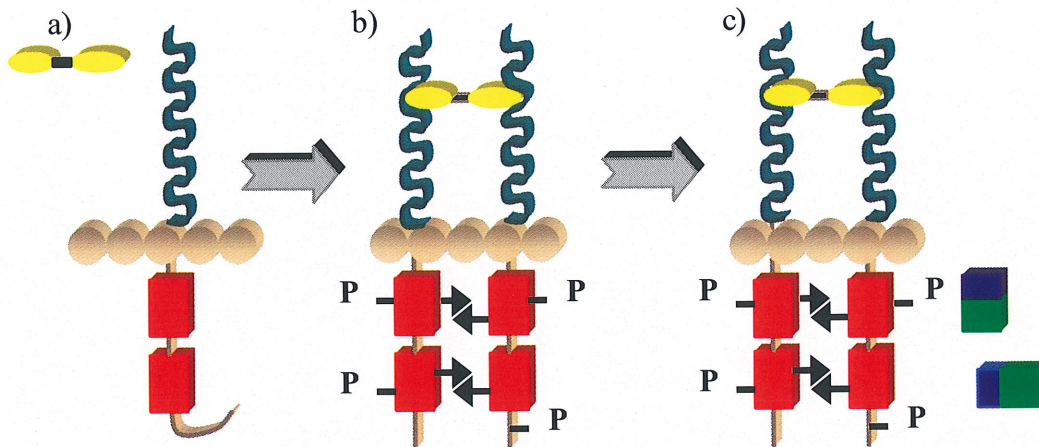
leurs particularités au niveau de leur organisation structurale (Heldin et Purton, 1996). De façon générale, ces RTKs possèdent 3 régions structurales distinctes; un domaine extracellulaire (domaine variable) responsable de la fixation ligand et de la transmission du signal au domaine cytoplasmique, une région transmembranaire servant d'ancre lipidique et une portion intracellulaire capable d'initier la transduction des signaux vers les cibles protéiques cytosoliques (Heldin et Purton, 1996). Le domaine cytoplasmique possède également, en plus du domaine tyrosine kinase, plusieurs séquences régulatrices composées de sites de phosphorylation à tyrosine, à sérine et à thréonine (Schlessinger et Ullrich, 1992).

L'évènement initiateur de la signalisation correspond à l'association du facteur de croissance à son récepteur caractéristique. Pour la plupart, ces facteurs sont sous forme dimérique et donc possèdent la capacité de lier deux récepteurs à la fois. Le " platelet-derived growth factor " ou PDGF par exemple, est composé de deux chaînes A et B jointes par un pont disulfure (Figure 2a). La dimérisation des récepteurs résultant de leur association à l'agoniste dimérique, favorise alors l'avènement du processus d'autophosphorylation au cours duquel chaque membre d'une paire phosphoryle certains résidus tyrosines dans la région intracellulaire de son partenaire (Figure 2b) (Heldin et Purton, 1996; Malarkey *et al.*, 1995). Or, il semblerait que cette autophosphorylation aurait pour conséquence l'induction de l'activité tyrosine kinase intrinsèque du récepteur qui constitue l'étape cruciale permettant la transduction des signaux (Heldin et Purton, 1996; Schlessinger et Ullrich, 1992). Des études de cristallographie aux rayons X ont suggéré que le site catalytique du récepteur à insuline (RTK) non phosphorylé est obstrué par une boucle d'activation contenant les résidus tyrosines 1158, 1162 et 1163, lesquels correspondent aux sites d'autophosphorylation. Suivant la phosphorylation du résidu Tyr1162 associé au site catalytique par pont hydrogène, il y aurait un changement conformationnel qui favoriserait le déplacement de cette boucle d'activation, libérant alors l'accès du site catalytique à d'autres substrats (Heldin et Purton, 1996).

L'autophosphorylation des récepteurs permettent également la création de sites de fixation à haute affinité dans la région immédiate entourant ces phosphotyrosines. Ces sites peuvent être reconnus spécifiquement par des protéines cytoplasmiques impliquées dans la transduction des signaux (Figure 2c). Cette interaction protéine-protéine est strictement dépendante de la phosphorylation des résidus tyrosines localisés dans la portion intracellulaire des récepteurs transmembranaires (Schlessinger et Ullrich, 1992). Ces molécules cibles doivent être caractérisées par la présence d'une région d'environ 100 acides aminés définie comme étant un domaine SH2 ("Src homology-2 domain") en vertu de sa similarité de séquence avec la région non catalytique des protéines tyrosine kinases de la famille *Src* (Pawson et Schlessinger, 1993; Malarkey *et al.*, 1995). Il semblerait que les résidus 1 à 3 localisés du côté carboxy-terminal de la phosphotyrosine détermine la spécificité de fixation des domaines SH2 pour un récepteur donné. La sous-unité de 85 kDa (p85) de la phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K) par exemple, contient deux domaines SH2. L'un d'eux, soit celui en C-terminal, reconnaît spécifiquement le motif pY(M/V)(D/E/P)M (où pY représente la phosphotyrosine) retrouvé chez plusieurs RTKs, mais ne fixe en aucun cas d'autres phosphotyrosines où la séquence diffère (Heldin et Purton, 1996; Pawson et Schlessinger, 1993). De plus, des analyses par cristallographie aux rayons X ont indiqué que le résidu arginine 175 (Arg175) conservé à travers tous les domaines SH2 serait critique pour qu'il y est interaction avec une phosphotyrosine particulière d'un récepteur donné (Waksman *et al.*, 1992; Malarkey *et al.*, 1995). En effet, ce résidu semble s'associer au groupement phosphate de la tyrosine et une simple délétion ou substitution de cette Arg175 entraîne automatiquement la perte de la capacité de fixation du domaine SH2, malgré la présence du motif qu'il reconnaît spécifiquement au niveau de la portion cytoplasmique du récepteur (Malarkey *et al.*, 1995).

Dès lors, lorsque l'interaction spécifique entre la phosphotyrosine d'un récepteur donné et le domaine SH2 d'une protéine particulière a lieu, il se produit un changement dans l'activité de la molécule cible suivant sa phosphorylation par le domaine tyrosine kinase du récepteur. Cette phosphorylation se fait sur des résidus tyrosines différents de ceux du

domaine SH2 impliqués dans la fixation du récepteur. L'exemple classique faisant état de cette distinction constitue la fixation de la phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) au récepteur du PDGF.



**Figure 2. Initiation du processus de signalisation par un récepteur à tyrosine kinase (PDGF).** (a) Fixation du ligand dimérique dans la portion extracellulaire de deux récepteurs à PDGF. (b) Activation du récepteur; la dimérisation favorise l'autophosphorylation croisée au cours de laquelle chaque membre d'une paire phosphoryle son partenaire. (c) Formation d'un complexe impliqué dans la transduction du signal. Certaines protéines caractérisées par la présence d'un domaine SH2, s'associent spécifiquement aux phosphotyrosines (P) des récepteurs activés et forment ainsi un complexe de signalisation.

En effet, cette PLC $\gamma$  comporte un domaine SH2 capable de reconnaître spécifiquement la tyrosine 1021 du récepteur. Cette interaction stimule alors la phosphorylation des résidus tyrosines en position 771, 783 et 1254 ce qui permet d'augmenter l'activité catalytique de la PLC $\gamma$  (Malarkey *et al.*, 1995). Par ailleurs, nombreuses sont les protéines cytoplasmiques (Grb2, Nck, p85) pouvant s'associer à des récepteurs à activité tyrosine kinase sans pour autant avoir de domaine catalytique. Ces protéines sont dites molécules adaptateurs. Leur rôle serait de recruter au niveau de la membrane plasmique d'autres intermédiaires protéiques caractérisés par une activité catalytique. Cette caractéristique importante assure la transmission du signal vers le noyau, puisque cette transduction résulte en une succession d'interactions protéine-protéine et d'activations concomitantes par phosphorylation des

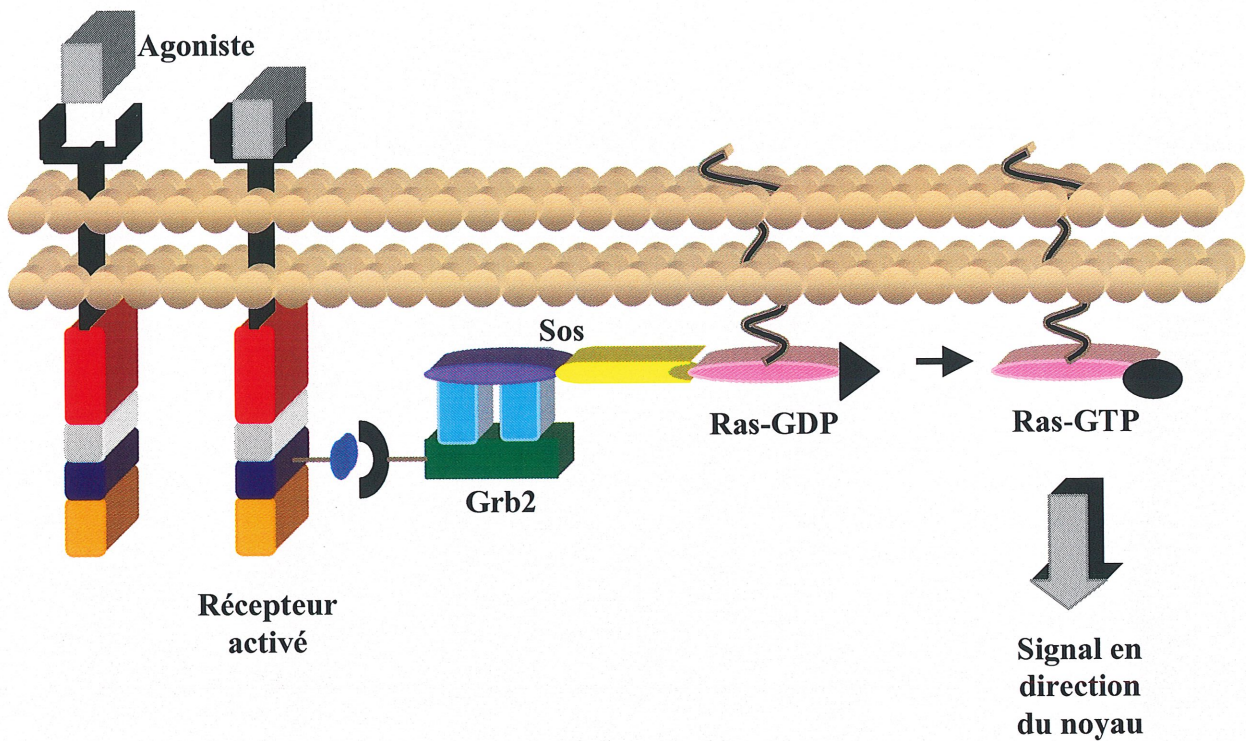
différents intermédiaires de la voie de signalisation empruntée. En plus d'un domaine SH2, certaines protéines possèdent également un domaine additionnel composé d'environ 50 à 60 acides aminés et connu sous le nom de domaine SH3 (Malarkey *et al.*, 1995). Ce domaine particulier permet aussi des interactions protéine-protéine. Plusieurs études impliquant l'utilisation de la mutagenèse et du criblage de banques au moyen de peptides synthétiques, ont permis d'identifier de nombreuses cibles des domaines SH3. Ces cibles seraient toutes caractérisées par la présence de régions riches en prolines et plus particulièrement du motif PXXP (Cicchetti *et al.*, 1992; Schlessinger, 1994). La Figure 3 offre un exemple permettant de visualiser l'implication d'une molécule adaptateur et de ses différents domaines dans l'activation de la protéine Ras. La stimulation du récepteur à EGF par son facteur de croissance correspondant, favorise l'autophosphorylation du récepteur sur le résidu Tyr1068. Cette phosphorylation permet l'interaction du récepteur avec la protéine Grb2, un adaptateur, au moyen de son domaine SH2. Le complexe protéique ainsi formé, permet de recruter la protéine Sos au niveau de la membrane plasmique grâce à ses séquences riches en prolines susceptibles d'interagir avec les deux domaines SH3 de la protéine Grb2. Cette association active donc Sos qui peut alors induire l'activation de Ras et permettre du même coup l'initiation de la transduction du signal vers le noyau (Pawson et Schlessinger, 1993).

### **Signalisation induite par des récepteurs à cytokines**

Outre les facteurs de croissance, les cytokines sont également des médiateurs extracellulaires impliqués dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire (Heldin et Purton, 1996; Wilks et Harpur, 1994). Ces protéines solubles telles que les interleukines et l'interféron, exercent leurs fonctions biologiques au moyen de récepteurs spécifiques exprimés à la surface des cellules cibles (Kishimoto *et al.*, 1994). Ces récepteurs sont en fait des glycoprotéines constitués d'un seul domaine transmembranaire et orientés de façon à ce que la région amino-terminale soit localisée à l'extérieur de la membrane



plasmique. Contrairement aux récepteurs à activité tyrosine kinase, les récepteurs à cytokines ne possèdent, au sein de leur séquence primaire, aucun motif doté d'une activité enzymatique quelconque. Ils ne sont nullement caractérisés par la présence d'un domaine tyrosine kinase



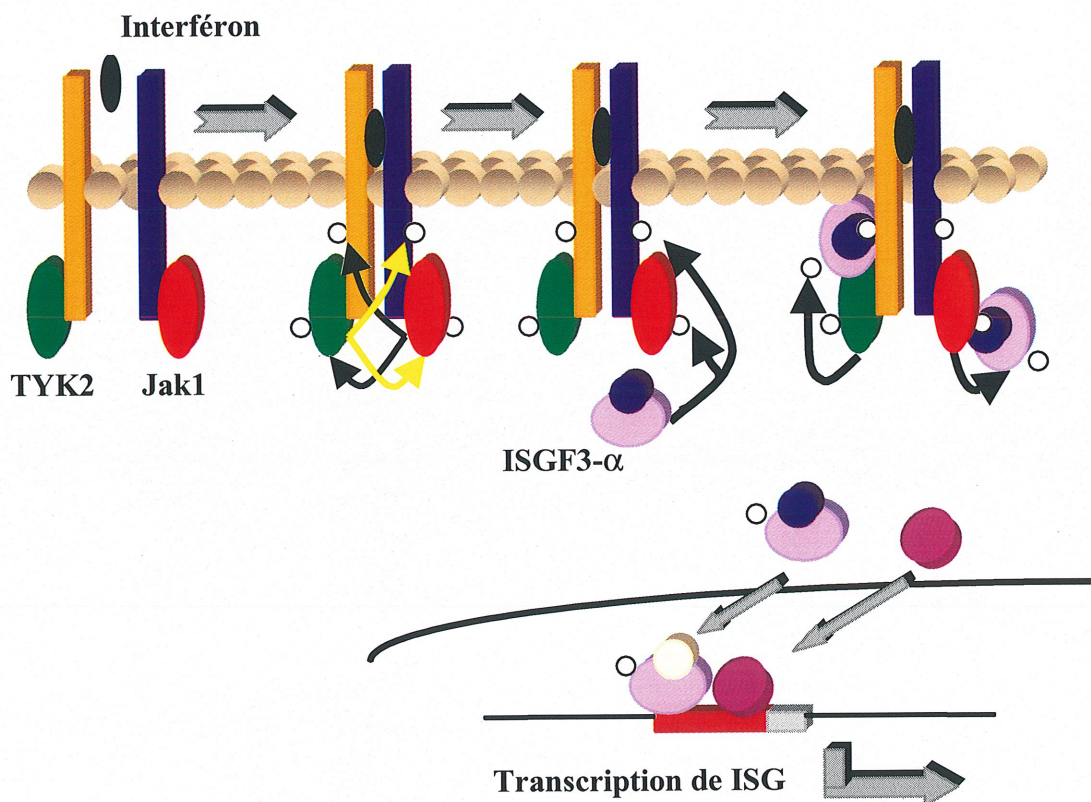
**Figure 3. Activation de la protéine Ras par le récepteur à EGF.** L'EGF induit l'autophosphorylation de la tyrosine 1068 du récepteur, ce qui favorise l'association de la protéine Grb2 au moyen de son domaine SH2 (■). La protéine Sos (▢), laquelle est associée aux domaines SH3 (▣) de Grb2 via ses régions riches en prolines, active Ras suite à la conversion du GDP (▲) en GTP (●).

similaire à celui rencontré chez tous les récepteurs capables d'interagir spécifiquement avec des facteurs de croissance (Taniguchi, 1995; Ziemiecki, 1994; Ihle et Keer, 1995). Pourtant, plusieurs études ont démontré que ces récepteurs deviennent phosphorylés sur leurs résidus tyrosines au même titre qu'une multitude de protéines cytoplasmiques impliquées dans la transduction des signaux, suivant leur stimulation par une cytokine correspondante (Ziemiecki *et al.*, 1994). Or, cette phosphorylation ne peut être que le résultat d'une activité tyrosine

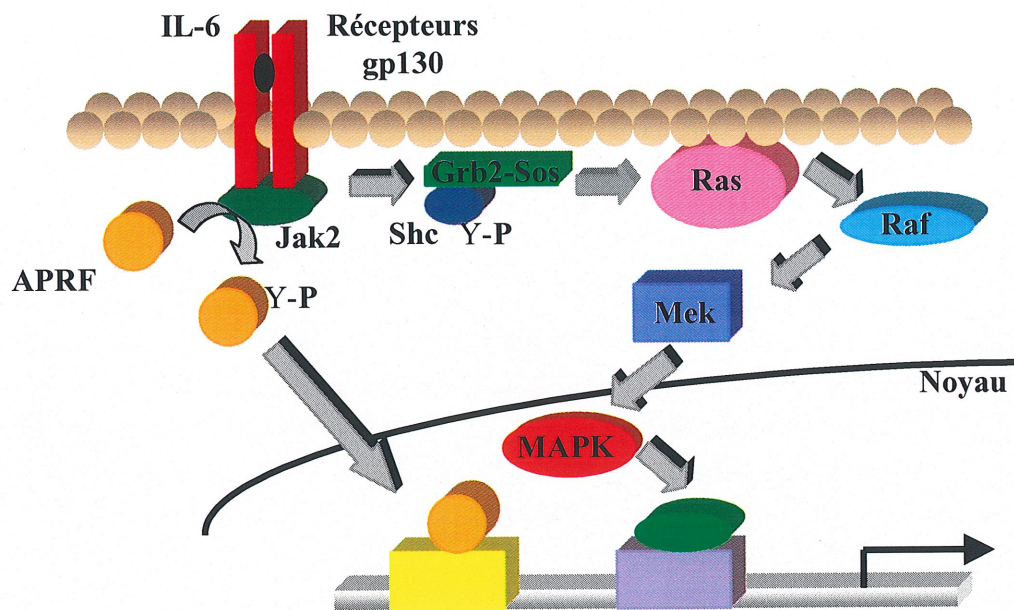
kinase, laquelle est absente! Le modèle actuellement accepté permettant d'éclaircir le mécanisme par lequel la transduction est possible, suggère qu'il y aurait à prime abord, dimérisation du récepteur de façon à offrir du côté cytoplasmique une surface de contact divalente (Kishimoto *et al.*, 1994 ). Cette surface favoriserait une stabilisation des interactions entre les récepteurs à cytokines et les différents effecteurs en aval. Suite à cette dimérisation, certaines protéines seraient recrutées puis associées au récepteur dans sa portion cytoplasmique. Ces protéines, appartenant à la famille des Jaks ("Janus kinase: Just another kinase"), sont en fait des tyrosine kinases intracellulaires qui lorsqu'elles voient leur concentration augmenter localement au niveau de la membrane plasmique, suite à leur recrutement, favorisent le processus de phosphorylation croisée analogue à celui des récepteurs à facteurs de croissance (Ihle et Kerr, 1995; Taniguchi, 1995). Ainsi, chaque PTK cytoplasmique associé au récepteur à cytokine phosphoryle non seulement son comparse, mais également le résidu tyrosine du récepteur avec lequel il s'associe (Wilks et Harpur, 1994). Par exemple, la fixation de l'interféron  $\alpha$  à son récepteur spécifique, favorise d'une part la dimérisation des récepteurs puis d'autre part, l'activation des protéines kinases qui y sont associées (Figure 4). Ces dernières, TYK2 et Jak1, en plus de s'activer mutuellement par phosphorylation croisée, activent les récepteurs dimériques. Il s'en suit l'association du facteur de transcription cytoplasmique ISGF3- $\alpha$  ("Interferon-stimulated-gene factor 3- $\alpha$ ") aux phosphotyrosines localisées tant au niveau des récepteurs que des PTKs, grâce à son domaine SH2. ISGF3- $\alpha$  complexé devient à son tour phosphorylé par l'activité tyrosine kinase de Jak1 ou TYK2, ce qui l'amène à se dissocier puis à se transloquer au noyau afin d'y exercer sa fonction biologique (Wilks et Harpur, 1994).

L'activation des membres de la famille des MAPKs peut également être initiée suivant l'activation d'un récepteur à cytokine. L'exemple classique constitue l'activation du récepteur à interleukine 6 (IL-6) (Figure 5). En effet, la dimérisation du récepteur (gp130-gp130), suivant son interaction avec son ligand correspondant, soit IL-6, permet l'activation des tyrosines kinases cytoplasmiques, en l'occurrence Jak2, nouvellement associées aux

récepteurs. Cette activation occasionne alors l'induction de la voie Ras-MAPK par l'intermédiaire d'une protéine adaptateur Shc. Celle-ci subit alors l'activité tyrosine kinase de Jak2 et voit son résidu tyrosine devenir phosphorylé. Cette phosphotyrosine peut ainsi interagir avec le domaine SH2 de Grb2, lequel s'associe à son tour avec Sos au moyen de ses 2 domaines SH3. L'ensemble de ces événements de phosphorylation entraîne l'activation subséquente d'une variété de facteurs de transcription qui moduleront l'expression de certains gènes. Parallèlement et de façon comparable, il est possible que Jak2 phosphoryle directement le résidu tyrosine de APRF ("ISGF like factor"), un facteur de transcription cytoplasmique, qui migre alors rapidement au noyau pour y exercer sa fonction (Kishimoto *et al.*, 1994).



**Figure 4. Modèle relatant l'implication des récepteurs à cytokines dans la transmission de l'information vers le noyau.** Induction du phénomène de dimérisation des récepteurs suite à la fixation de l'interféron  $\alpha$  et à l'activation des protéines tyrosine kinases (TYK2, Jak1) qui y sont associées. Celles-ci permettent l'activation des récepteurs, ce qui favorise par la suite l'induction de l'activité de ISGF3 $\alpha$ .



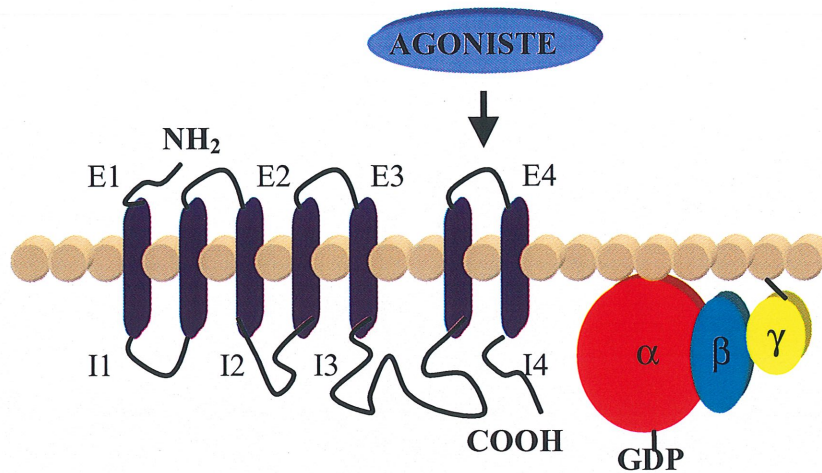
**Figure 5. Modèle évoquant la transduction des signaux par l'intermédiaire des récepteurs à cytokines.** La fixation de l'interleukine-6 (IL-6) induit le processus de dimérisation des récepteurs correspondants, lesquels deviennent actifs suite à leur phosphorylation par Jak2, une tyrosine kinase cytoplasmique. La transmission du signal est induite et se propage vers le noyau par l'intermédiaire de la voie de signalisation Ras, ou directement par le facteur de transcription cytoplasmique APRF.

### Signalisation induite par des récepteurs couplés à des protéines G

Outre les facteurs de croissance, il existe d'innombrables signaux chimiques et physiques qui bombardent la surface cellulaire. Plusieurs d'entre eux doivent s'associer à des récepteurs spécifiques pour initier la transduction de l'information vers l'intérieur de la cellule, au même titre que les facteurs de croissance et leurs récepteurs à activité tyrosine kinase. Les hormones telles que la catécholamine, la gonadotropine, l'hormone de la parathyroïde et le glucagon, doivent interagir avec les membres d'une famille de récepteurs appelée récepteurs couplés à des protéines G (GPCRs) (Neer, 1995). Ces récepteurs sont des glycoprotéines constitués d'une unique chaîne polypeptidique caractérisée par la présence

d'un domaine transmembranaire composé de 7 motifs (TM1-TM7) en conformation hélicoïdale (Heldin et Purton, 1996; Linder et Gilman, 1992; Strader *et al.*, 1994; Sugden et Clerk, 1997). Chacune de ces hélices  $\alpha$  possède entre 20 et 25 acides aminés, lesquels sont principalement des résidus hydrophobes (Strader *et al.*, 1994; Heldin et Purton, 1996). Elles sont reliées entre elles par l'alternance de boucles hydrophiles extracellulaires et intracellulaires. La région amino-terminale constitue l'un des quatre domaines (E1-E4) localisé dans la portion extracellulaire du récepteur, alors que la région carboxy-terminale est dans la portion intracellulaire du récepteur (I1-I4) (Figure 6) (Strader *et al.*, 1994; Heldin et Purton, 1996).

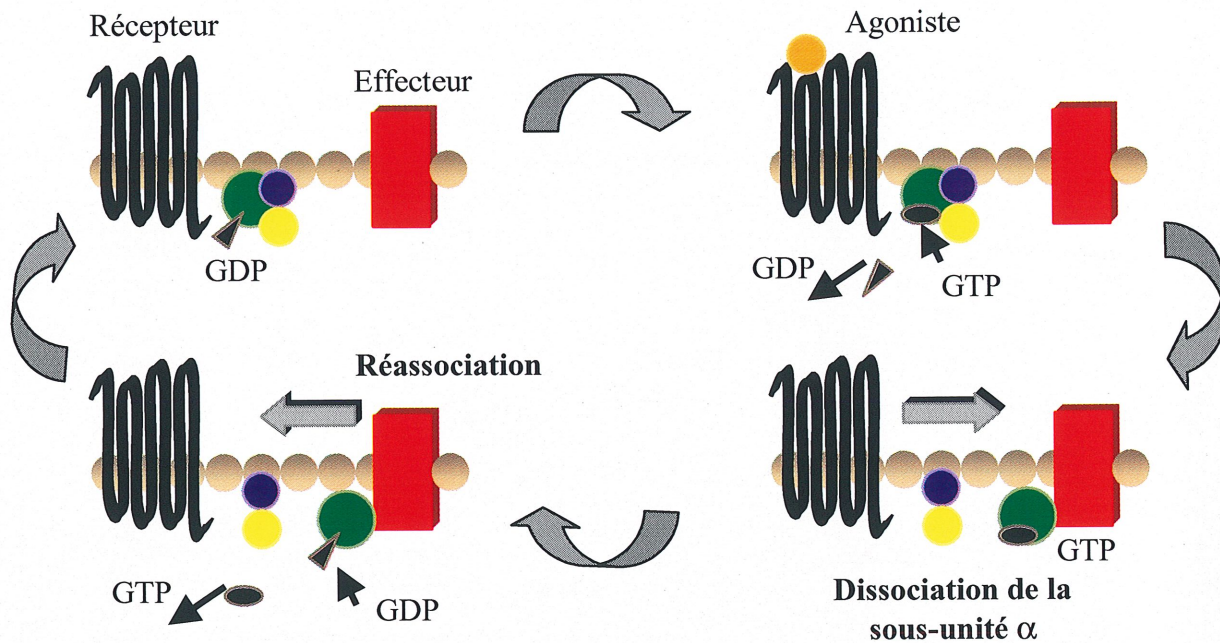
Ces récepteurs GPCRs, comme leur nom l'indique, sont couplés à des protéines G hétérotrimériques cytoplasmiques, lesquelles sont associées à la surface interne de la membrane plasmique par myristoylation et palmitoylation (Linder et Gilman, 1992; Coleman *et al.*, 1994; Strader *et al.*, 1994). Elles sont constituées de 3 sous-unités protéiques soit la sous-unité  $\alpha$  (39-46KDa), la sous-unité  $\beta$  (35-36KDa) et la sous-unité  $\gamma$  (~8 KDa). Ces protéines sont capables d'activer ou d'inhiber une variété d'effecteurs protéiques impliqués dans la transduction des signaux, grâce à la capacité du récepteur à catalyser la conversion du GDP en GTP en réponse à une stimulation extracellulaire (hormones, neurotransmetteurs, lumière,...) (Lambright *et al.*, 1994). Le mécanisme par lequel cette conversion est possible résulte à prime abord d'un changement conformationnel du récepteur occasionné par sa fixation à son agoniste extracellulaire (Figure 7). Cette modification favorise alors l'association de la protéine G au récepteur, laquelle suivant cette interaction change également de conformation ce qui réduit l'affinité de cet hétérotrimère pour le GDP. Il en résulte le relâchement de cette molécule (Neer, 1995). La libération du site de fixation permet ainsi au GTP de s'y associer à son tour puisque sa concentration cellulaire est supérieure à celle



**Figure 6. Représentation schématique d'un récepteur couplé à une protéine G hétérotrimérique.**

caractéristique du GDP. À nouveau, il y aura altération de la conformation de la sous-unité  $\alpha$ , ce qui lui permet d'être activée (Linder et Gilman, 1992; Lambright *et al.*, 1994). Dès lors, cette activation favorise l'augmentation de l'affinité de cette sous-unité pour différents effecteurs associés à la membrane de même qu'une réduction de son affinité pour le complexe  $\beta\gamma$  (Lambright *et al.*, 1994). Il s'en suit la dissociation de cet hétérotrimère de façon à ce que la sous-unité  $\alpha$ , couplé au GTP, diffuse le long de la membrane plasmique pour ensuite s'associer à un effecteur, tel que l'adényl cyclase ou la GMP-cyclique phosphodiesterase rétinale. Cette association induit alors l'activation de cet effecteur, lequel peut ainsi propager à son tour le signal vers l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire de voies de signalisation caractéristiques. Il suffit de quelques secondes à la sous-unité  $\alpha$  pour reconverter le GTP en GDP par hydrolyse grâce à son activité GTPase intrinsèque. Ceci entraîne son inactivation suivie par sa dissociation avec l'effecteur. Il y aura réassociation de la sous-unité  $\alpha$  au complexe  $\beta\gamma$  libre dans le but de reformer la protéine G hétérotrimérique latente, prête à réagir à une nouvelle stimulation extracellulaire (Linder et Gilman, 1992). En somme, le taux d'hydrolyse du GTP constitue le facteur limitant qui permet de réguler la durée d'activation

des différentes sous-unités de la protéine G, puisque cette réaction engendre la réassociation des sous-unités suite à leur inactivation et donc à la reconstruction de la protéine maintenant inactive (Neer, 1995).



**Figure 7. Modèle explicatif du mode d'activation des protéines G.** Au repos, la protéine G est constituée de 3 sous-unités, dont la sous-unité  $\alpha$  (●) qui est associée au GDP. Lorsqu'il y a fixation de l'agoniste à son récepteur correspondant, la protéine G échange le GDP pour du GTP, ce qui a pour effet son activation. Cet hétérotrimère se dissocie alors et permet à la sous-unité  $\alpha$  maintenant associée au GTP, de diffuser le long de la membrane plasmique afin d'interagir avec un effecteur spécifique. Ce dernier devient à son tour activé. Quelques secondes plus tard suffises à la sous-unité  $\alpha$  pour reconvertir le GTP en GDP, favorisant dès lors son inactivation. Il y aura reformation du complexe hétérotrimérique et retour à la normale. La sous-unité  $\beta$  (●) et la sous-unité  $\gamma$  (●).

Pendant longtemps, la communauté scientifique croyait que la sous-unité  $\alpha$ , couplée au GTP, constituait à elle seule l'activateur de l'effecteur. Le complexe  $\beta\gamma$  jouait uniquement le rôle de régulateur négatif nécessaire à la reformation de l'hétérotrimère inactif (Linder et Gilman, 1992). Cependant, de récentes études ont permis d'observer certaines évidences suggérant l'implication du complexe  $\beta\gamma$  dans la signalisation (Noël *et al.*, 1993). En effet, il

aurait la capacité d'activer ou d'inhiber certains effecteurs (canaux  $K^+$ , phospholipase  $A_2$ , PI3-K, phospholipase C,...), au même titre que la sous-unité  $\alpha$  (Clapham et Neer, 1993; Neer, 1995). Ce complexe pourrait même induire la voie des MAPKs par l'activation de Ras (Crespo *et al.*, 1994). Par conséquent, différents effecteurs pourraient être régulés soit par la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G, soit par le complexe  $\beta\gamma$ . Il semblerait également que certains effecteurs soient modulés par l'une ou l'autre des sous-unités ou encore, qu'ils soient régulés au moyen de la sous-unité  $\alpha$  de connivence avec le complexe  $\beta\gamma$ . De plus, certaines analyses ont permis de suggérer que le sous-unité  $\alpha$  et le complexe  $\beta\gamma$  peuvent induire un signal divergeant s'ils agissent sur une cible différente ou convergeant s'ils agissent sur la même cible. L'effet ultime, c'est-à-dire l'activation ou l'inhibition de l'effecteur, dépendra à la fois de l'agoniste extracellulaire, de la protéine G et de l'effecteur proprement dit (Clapham et Neer, 1993).

### **Domaines d'interaction impliqués dans la signalisation**

Les interactions physiques entre protéines appartenant à la grande famille des kinases seraient essentielles voire critiques dans l'exécution et la régulation des différents processus cellulaires. En effet, l'avènement d'innombrables techniques en biologie moléculaire telles que la cristallographie aux rayons X, a permis de démontrer l'importance de petits modules protéiques impliqués dans la régulation de la transduction des signaux. Cette importance se traduit par leur capacité à médier de nombreuses interactions protéine-protéine au sein des différentes cascades (Pawson, 1995). Nous avons vu précédemment leur implication directe dans la transmission du signal des récepteurs activés au niveau de la membrane plasmique, aux effecteurs cytoplasmiques localisés en aval. Une simple mutation aussi anodine soit-elle au sein de ces modules, peut occasionner des conséquences désastreuses favorisant l'établissement de nombreuses anomalies dont différentes formes de cancers et désordres génétiques sévères incluant le syndrome de Liddle (syndrome de l'hypertension) et la dystrophie musculaire (Sudol, 1996).



On compte à ce jour plus de 60 modules protéiques distincts, lesquels étant tous nommés et classifiés (Bork *et al.*, 1997). Cependant, un certains nombres de caractéristiques communes peuvent se dégager suite à des études structurales et fonctionnelles faites sur différents complexes domaine-ligand (Sudol, 1998). En effet, ces domaines possèdent entre 40 et 150 acides aminés arrangés de façon à promouvoir la formation d'une ou plusieurs surfaces de fixation du ligand appelé pochette de reconnaissance. Ils comportent également plusieurs résidus conservés directement impliqués, d'une part, dans son association avec un ligand correspondant et d'autre part dans le maintien de la structure du domaine. Le ligand, quant à lui, interagit au moyen d'une courte séquence particulière composée uniquement de 3 à 6 acides aminés. La spécificité de l'interaction relève de la présence d'acides aminés localisés de part et d'autre du motif, dictant ainsi la famille de modules susceptible d'être reconnue. Il est certain que la variabilité qui caractérise la structure primaire du domaine contribue également à la spécificité de l'interaction (Sudol, 1998).

### **Domaines SH2/SH3**

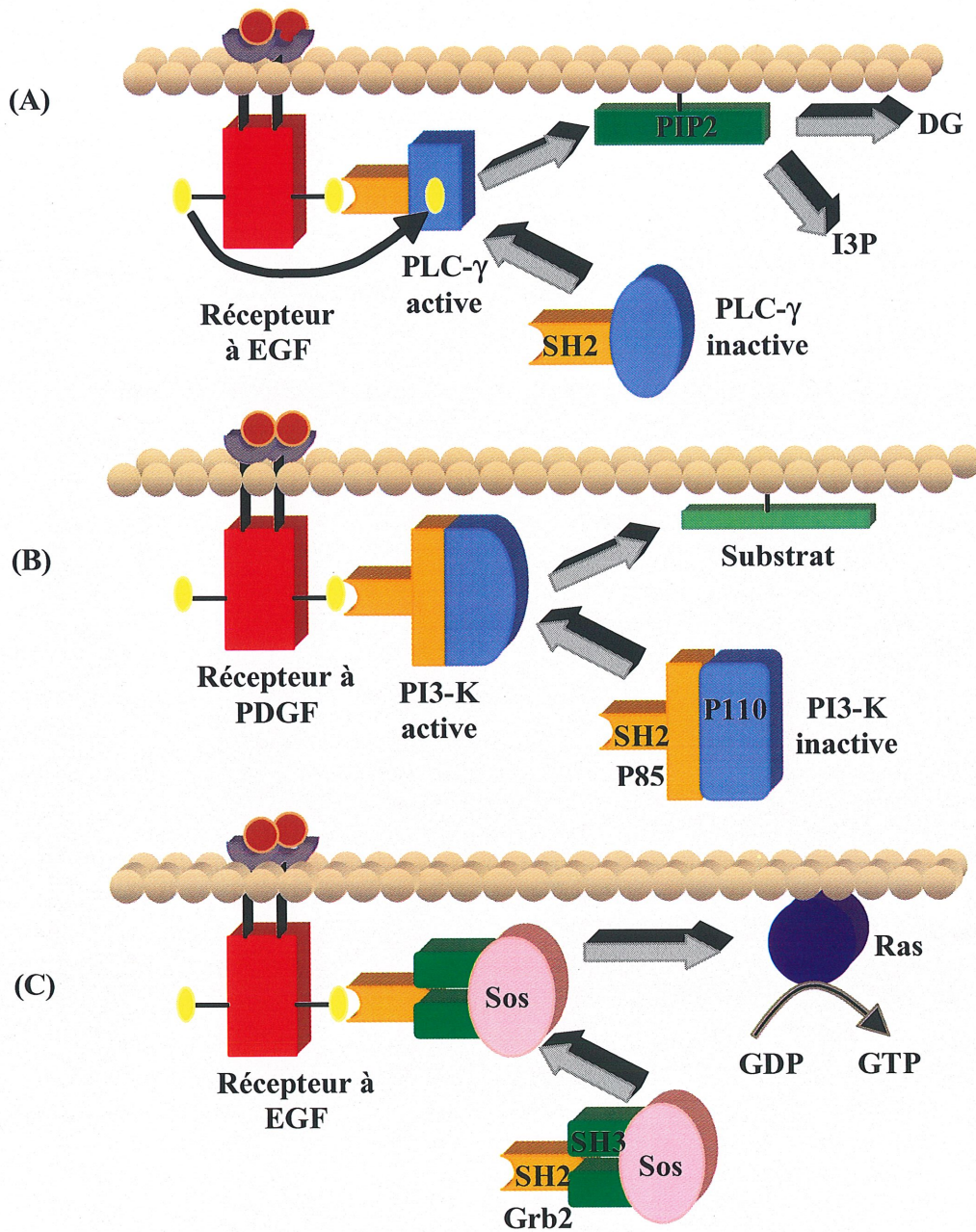
Nous avons vu précédemment que les domaines SH2 et SH3 reconnaissent respectivement des séquences en acides aminés contenant des phosphotyrosines et des régions riches en prolines. Or, quelles sont les expérimentations qui ont mené à la découverte de ces sites de fixation et en quoi leur identification a permis de suggérer les rôles potentiels joués par ces petits modules protéiques. En fait, la découverte des domaines SH2 est attribuable à l'étude des mécanismes par lesquels les RTKs activent les différentes voies de signalisation, un sujet très à la mode au début des années 90 (Pawson et Schlessinger, 1993). Des expériences, au cours desquelles le résidu tyrosine du site d'autophosphorylation a été muté pour une phénylalanine, ont montré que l'interaction entre le récepteur activé et les différentes voies de signalisation intracellulaires était spécifique et requise. Par exemple, le mutant du récepteur à PDGF caractérisé par la présence d'une phénylalanine au lieu d'une tyrosine en position 1021 fixe faiblement la PLC- $\gamma$ 1 et ne stimule en aucun cas l'hydrolyse du

phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. Ainsi, ces résultats suggèrent que ce motif SH2 fixe spécifiquement et ce avec une grande affinité, les sites d'autophosphorylation du récepteur, médiant par le fait même les interactions primaires entre les RTKs et leurs substrats correspondants (Pawson et Schlessinger, 1993).

Contrairement au domaine SH2, la fonction biologique exacte exercée par le domaine SH3 est incertaine (Bar-Sagi *et al.*, 1993). Cependant, il semblerait que ce petit module protéique serait non seulement capable d'interagir spécifiquement avec certaines protéines, mais serait aussi impliqué dans la transmission des signaux de la surface cellulaire à partir des récepteurs à activité tyrosine kinase aux effecteurs situés en aval (Pawson et Schlessinger, 1993). En effet, certaines études ont démontré que la délétion du domaine SH3 des protéines tyrosine kinases c-Src et c-Abl conduisait à l'activation de leur capacité oncogénique. Cette activation serait le résultat d'une déficience au niveau de la régulation de l'activité kinase et de sa capacité à interagir avec d'autres protéines. Ainsi, il est possible de penser que ce petit motif d'environ 50 à 60 acides aminés aurait un rôle régulateur en ce sens qu'il permettrait de médier les interactions entre différentes kinases et des protéines caractérisées par une fonction régulatrice (Cicchetti *et al.*, 1992; Pawson et Schlessinger, 1993; Isakov *et al.*, 1994). Or, l'expérience qui a permis de démontrer à prime abord la nature du motif SH3 en tant que site potentiel de fixation, constitue le clonage de la protéine 3BP-1 (Cicchetti *et al.*, 1992; Pawson et Schlessinger, 1993; Bar-Sagi *et al.*, 1993). Cette dernière a été isolée au moyen d'une sonde protéique correspondant au domaine SH3 de la protéine kinase c-Abl. Des analyses de séquence de la protéine 3BP-1 ont révélé la présence d'une courte séquence riche en prolines (8 à 10 résidus) capable d'interagir avec le module SH3 de c-Abl (Pawson et Schlessinger, 1993).

Les interactions protéiques qui résultent de la reconnaissance spécifique des domaines SH2 et SH3 pour leurs séquences particulières, permettent l'activation d'intermédiaires nécessaires à la transmission du signal. Or, quels sont les mécanismes par lesquels ces petits

motifs protéiques permettent la modulation de l'activité des enzymes qui les possèdent. En fait, il y aurait trois mécanismes d'activation des molécules comportant des domaines SH2/SH3 par des récepteurs à activité tyrosine kinase (Pawson et Schlessinger, 1993; Schlessinger, 1994; Cohen *et al.*, 1995). Le premier implique tout simplement le phénomène de phosphorylation sur des résidus tyrosines (Figure 8a). Il a été démontré que cette phosphorylation serait nécessaire dans l'activation de la PLC $\gamma$  par exemple (Schlessinger, 1994). En effet, l'activation du récepteur à EGF suivi par son autophosphorylation, permet l'association des domaines SH2 de la PLC $\gamma$  aux phosphotyrosines du récepteur. Cette interaction assure alors la phosphorylation efficace de la PLC $\gamma$  par le domaine tyrosine kinase du récepteur. Il s'en suit l'activation de la PLC $\gamma$  maintenant apte à hydrolyser son substrat localisé au niveau de la membrane plasmique. Le second mécanisme est caractérisé par un changement de conformation (Figure 8b). Des études approfondies du processus d'activation de la PI3-K auraient permis de le démontrer. Il semblerait que la sous-unité régulatrice de 85kDa (p85), suivant sa fixation aux résidus tyrosines du récepteur à PDGF, subirait un changement conformationnel. Ce changement serait par la suite transmis à la sous-unité catalytique (p110) assurant dès lors l'augmentation de son activité. Le troisième mécanisme implique cette fois-ci la relocalisation subcellulaire d'un élément clef nécessaire au processus d'activation d'une voie de transduction donnée (Figure 8c). La protéine Grb2, comme il a déjà été mentionné, constitue une protéine adaptateur. En effet, elle permet de faire un pont entre le récepteur à EGF et la voie de signalisation Ras, grâce à ses domaines SH3 capables de reconnaître spécifiquement des motifs riches en prolines de la protéine Sos. Cette interaction (Grb2/Sos) est essentielle à l'activation de Ras puisque la protéine Grb2 ne possède aucune activité intrinsèque. Or, Sos possède cette activité mais elle n'est effective que lorsqu'elle est transloquée au niveau de la membrane plasmique. En aucun cas son activité est détectable suivant sa stimulation par le EGF. Certains chercheurs ont alors proposé que la formation du complexe récepteur/Grb2/Sos permettait d'augmenter localement la concentration de Sos, l'élément clef, à l'endroit même où Ras est localisé. Ainsi, Sos pourrait dès lors échanger le GDP pour du GTP et par le fait même induire l'activation de Ras.



**Figure 8. Mécanisme d'activation des molécules caractérisées par des domaines SH2/SH3 via des récepteurs à facteurs de croissance.** (a) Activation par phosphorylation du résidu tyrosine. Le domaine SH2 de la PLC $\gamma$  s'associe à la phosphotyrosine du récepteur à EGF. (b) Activation au moyen d'un changement conformationnel. L'interaction entre la phosphotyrosine du récepteur à PDGF et le domaine SH2 de p85 occasionne un changement dans la conformation de la PI3-K, ce qui induit son activité enzymatique. (c) Activation par relocalisation subcellulaire. Les domaines SH3 de l'adaptateur protéique Grb2 permettent de recruter au niveau de la membrane plasmique la protéine Sos.

## Domaines WW/WWP

Outre ces domaines SH2/SH3, il existe d'innombrables petits modules protéiques impliqués dans l'avènement des interactions protéine-protéine. Le domaine WW/WWP constitue, entre autres, l'un de ces motifs. Il est composé d'environ 35 à 40 résidus et son appellation fait référence à la présence de 2 résidus tryptophanes (W) hautement conservés, lesquels étant séparés par 20-22 acides aminés. Les diverses protéines caractérisées par la présence de ce motif sont subdivisées en 2 groupes, soit le groupe I qui reconnaît spécifiquement la séquence consensus PPxY, et le groupe II s'associant à la séquence PPLP (Pawson and Scott, 1997; Sudol, 1998).

Une récente étude publiée par le groupe du Docteur Leder, semble suggérer l'existence d'une interrelation fonctionnelle entre les domaines SH3 et WW/WWP (Chan *et al.*, 1996). En effet, cette hypothèse résulte d'une étude réalisée sur la formine, une protéine impliquée dans le développement des membres et des reins chez la souris. Cette dernière comporte au sein de sa structure primaire, une région polyproline similaire à celle reconnue par le domaine SH3 de la protéine c-Abl. Cette découverte suggère donc la possibilité que la formine puisse interagir avec différentes protéines caractérisées par un domaine SH3, dans le but d'exercer sa fonction au cours du développement embryonnaire. Or, grâce au criblage d'une banque d'expression chez la souris au moyen de la région riche en prolines de la formine, Chan et ses collaborateurs (1996) ont identifié 2 groupes de protéines susceptibles d'interagir avec cette séquence. Le premier groupe comporte différentes protéines caractérisées par un motif SH3 alors que le deuxième groupe est composé par des protéines possédant un motif WW/WWP (ceux du groupe II qui reconnaissent la séquence PPLP). Ils ont également démontré que ces domaines WW/WWP étaient capables de compétitionner directement avec le domaine SH3 de c-Abl pour s'associer à la séquence proline riche de la formine. Ainsi, il est possible de proposer l'implication des domaines WW/WWP dans la régulation de la fonction des motifs SH3 grâce à leur capacité à reconnaître des séquences

riches en prolines analogues à celles reconnues par les domaines SH3 (Sudol, 1996). Dans un tel cas, nous pourrions avoir le tout premier exemple de "dégénérescence du code des interactions protéine-protéine" dont le rôle serait, au même titre que celui du code génétique, de contrecarrer ou de minimiser les effets négatifs générés par diverses mutations. Il est possible également que cette dégénérescence offre un mécanisme permettant la convergence des différentes voies de signalisation (Sudol, 1996; Sudol, 1998). Croire en l'existence d'un tel code n'est en aucun cas absurde compte tenu de l'importance qu'occupent les différents modules protéiques dans le processus de transmission des signaux et ce à tous les niveaux dans les diverses cascades enzymatiques.

## **Domaines PH**

Depuis 1993, le motif PH d'environ 100 acides aminés, a fait son apparition suite à la découverte du substrat majeur de la PKC, la pleckstrine (Haslam *et al.*, 1993). En effet, cette protéine substrat est caractérisée par la présence de 2 modules, l'un en N-terminal, l'autre en C-terminal, maintenant appelés les "séquences mères", qui permettent de définir les membres pouvant appartenir à cette famille de domaines PH ou "Pleckstrin homology domain". On compte à ce jour plus de 100 motifs PH différents dont certains caractérisent plusieurs enzymes ayant des fonctions de régulation importantes (Shaw, 1996). Des études ont également démontré leur association et parfois même leur implication en tant qu'agent causal de nombreuses maladies humaines. L'agammaglobulinémie associée au chromosome X (XLA) constitue indéniablement l'un des exemples permettant de mettre en lumière cette relation. En effet, une simple mutation ponctuelle au coeur même du domaine PH de la tyrosine kinase Btk, normalement exprimée dans les lymphocytes B, peut non seulement empêcher la formation de ces cellules mais également prévenir la production d'anticorps, des acteurs indispensables au bon fonctionnement du système immunitaire (Shaw, 1996).

Il existe plusieurs modèles permettant de dresser un tableau relatant la fonction réalisée par les motifs PH. Selon certaines études, ces motifs seraient aptes à s'associer autant à des protéines qu'à divers phosphates inositol. En effet, le récepteur  $\beta$ -adrénergique ( $\beta$ -ARK), une protéine kinase cytosolique, contient dans sa portion carboxy-terminale un site de fixation pour les sous-unités  $\beta\gamma$  des petites protéines G ( $G\beta\gamma$ ), qui comme nous l'avons vu précédemment sont normalement couplées à des récepteurs localisés au niveau de la membrane plasmique. Or la translocation de cette enzyme près de la membrane est essentielle à l'activation du récepteur  $\beta$ -adrénergique ( $\beta$ -AR) et des récepteurs couplés à des protéines G qui lui sont associés, grâce à leur phosphorylation par la  $\beta$ -ARK. Fait intéressant, le site de fixation  $G\beta\gamma$  de la  $\beta$ -ARK est un domaine PH. La relocalisation de la phospholipase C (PLC) au niveau de la membrane plasmique constitue un second exemple qui met en évidence l'implication des modules PH dans le processus de transduction des signaux. En effet, l'activation de la PLC résulte en son association à la membrane plasmique grâce à la fixation de son domaine PH à une molécule de phosphatidyinositol-4,5-*bis*phosphate (PIP<sub>2</sub>). Cette fixation permet par la suite l'hydrolyse de cette PIP<sub>2</sub> en une molécule d'inositol-trisphosphate soluble (IP<sub>3</sub>), laquelle pouvant à son tour s'associer à de nouvelles PLC cytosoliques toujours par l'intermédiaire de leur domaine PH. Ces motifs constituent donc avec les domaines SH2 et SH3, des modules responsables de la formation de complexes protéiques associés à la membrane (Shaw, 1996).

### **Cascade des MAPKs**

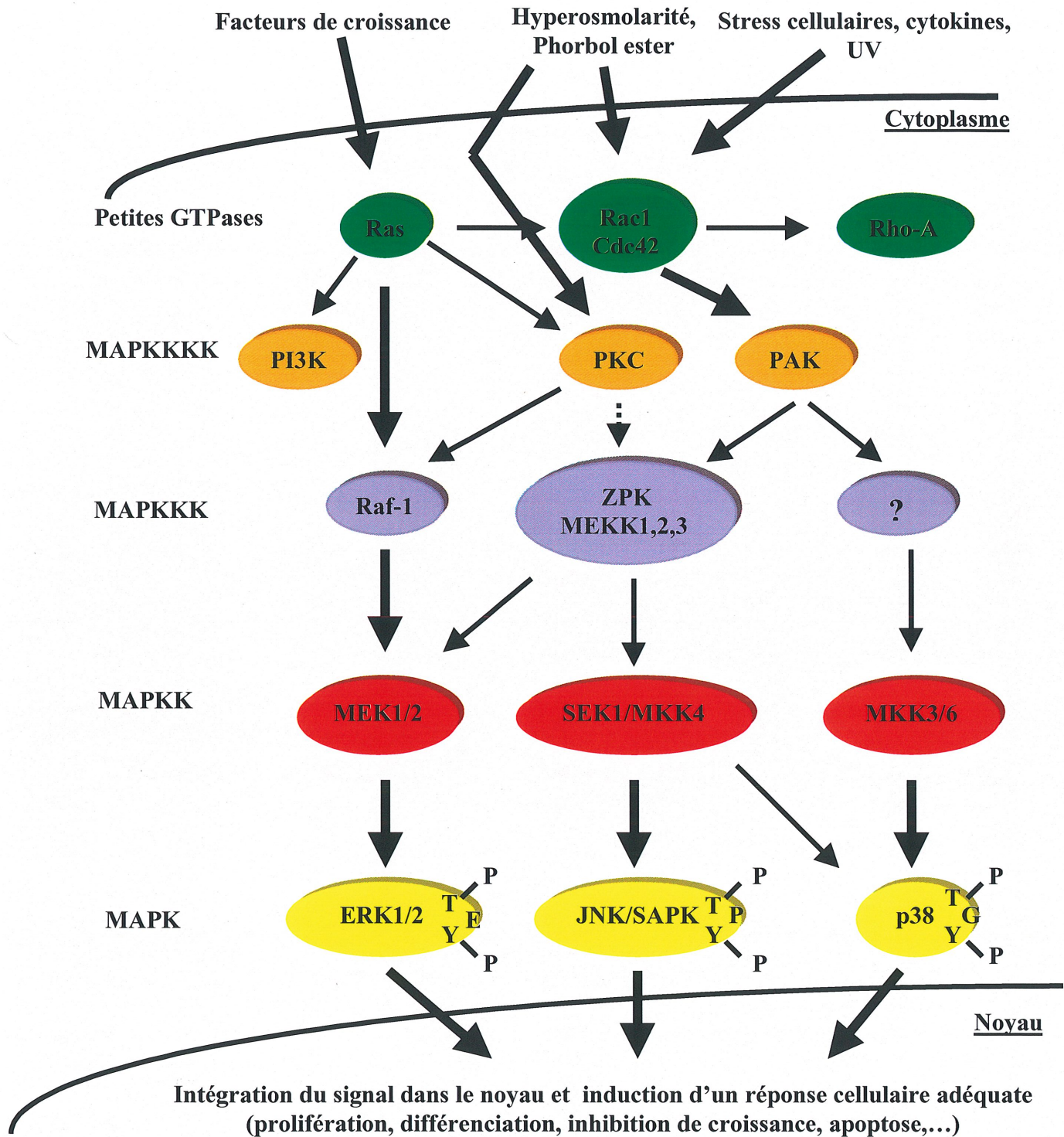
Les médiateurs de signaux de transduction localisés au niveau du cytoplasme sont à la fois des protéines tyrosine kinases, des protéines sérine/thréonine kinases et des protéines à double spécificité. La majorité d'entre elles appartiennent à la famille des "mitogen-activated protein kinases" (MAPKs). Ces membres sont subdivisés en niveaux successifs (MAP4K, MAPKKK, MAPKK, MAPK) traduisant le parcours emprunté par le signal, le niveau MAPK étant celui le plus éloigné du site d'initiation de la transduction (Seger et Krebs, 1995)

(Figure 9). Le mécanisme par lequel la transmission est possible se caractérise par une cascade séquentielle de phosphorylation et d'activation de protéines kinases en direction du noyau. En somme, les membres du niveau MAPKK sont phosphorylés puis activés par ceux appartenant au niveau supérieur, soit le niveau MAPKKK, pour ensuite phosphoryler et activer à leur tour les membres du niveau MAPK. Ces derniers seront transloqués au noyau pour y phosphoryler certains facteurs de transcription ou protéines nucléaires impliquées dans la régulation de la transcription et ainsi moduler l'expression de gènes particuliers (Davis, 1993; Kiefer *et al.*, 1996). Le mécanisme par lequel cette translocation est possible n'a malheureusement pas encore été totalement élucidé. Cependant, certaines études ont démontré l'implication d'une séquence NES ("nuclear export signal sequence") présente chez MEK, une MAPKK. En effet, il semble que cette séquence soit à la fois nécessaire à la localisation cytoplasmique de MEK et à la rétention ou à la séquestration de la MAPK (ERK) au niveau du cytoplasme. Seule la stimulation de cette voie peut entraîner la dissociation du complexe MEK/MAPK et ainsi favoriser la progression de la MAPK en direction du noyau, alors que MEK demeure au cytoplasme (Fukuda *et al.*, 1997). Ainsi, MEK joue à la fois le rôle d'activateur direct de la MAPK et de protéine d'ancrage au niveau du cytoplasme.

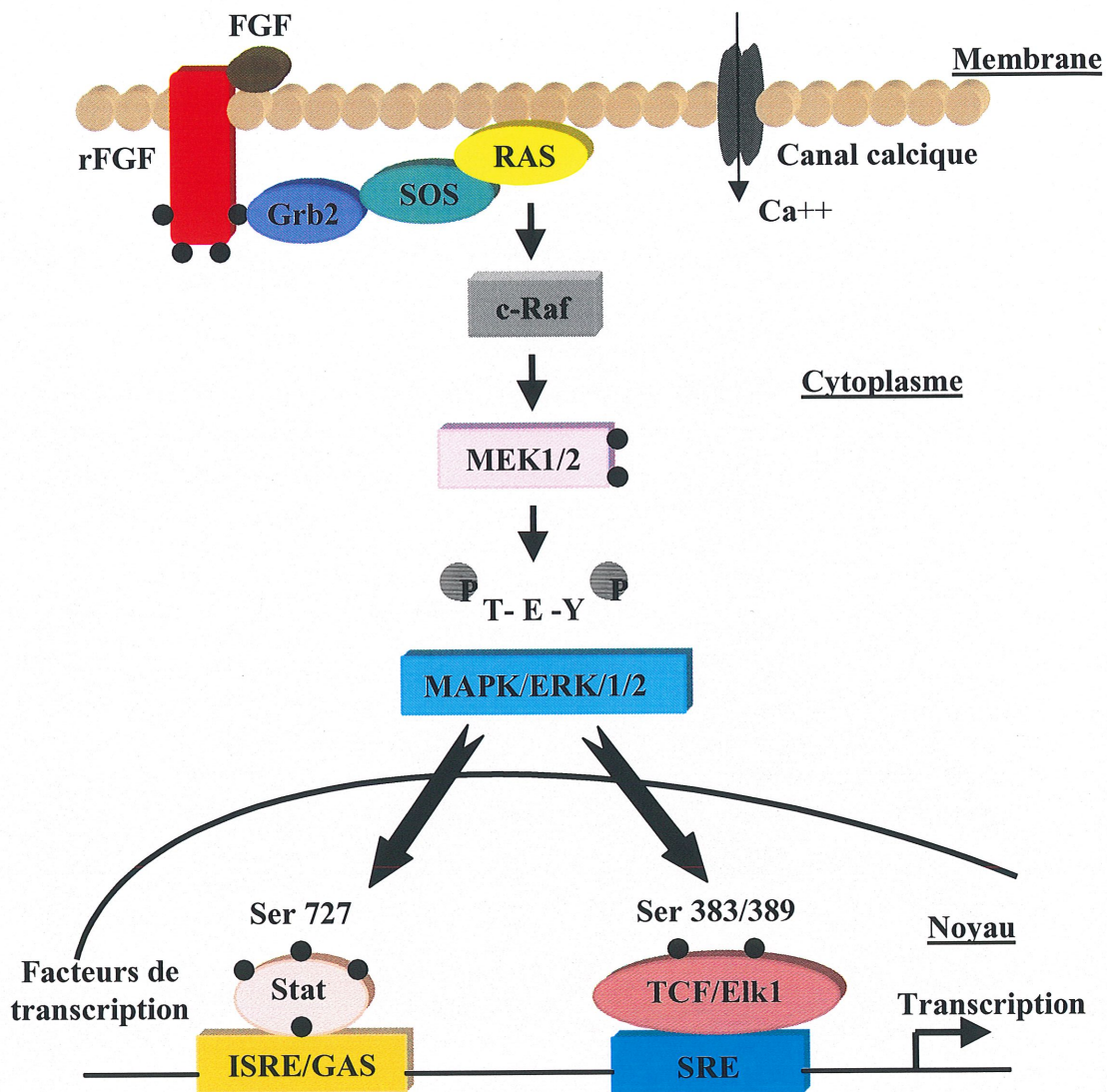
Chez les mammifères, il existe 3 voies de signalisation importantes dans la cascade des MAPKs. La mieux connue constitue la voie Ras → Raf → MEK → ERK (Figure 10) (où MEK signifie "mitogen-activated protein (MAP) kinase/ERK kinase" et ERK "extracellular-signal-regulated kinase") qui est typiquement stimulée par des facteurs de croissance. Les deux autres voies, soit SAPK/JNK (Figure 11) et p38 (Figure 12), sont stimulées au moyen de cytokines, d'hormones et d'une variété de stress (Kyriakis et Avruch, 1996). Originellement, la communauté scientifique croyait, grâce à des études faites chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Seger et Krebs, 1995), que ces voies étaient parallèles et distinctes en ce sens qu'elles ne pouvaient être activées simultanément en réponse à un même stimulus. Toutefois, il semblerait que l'activation d'une ou de plusieurs cascades de



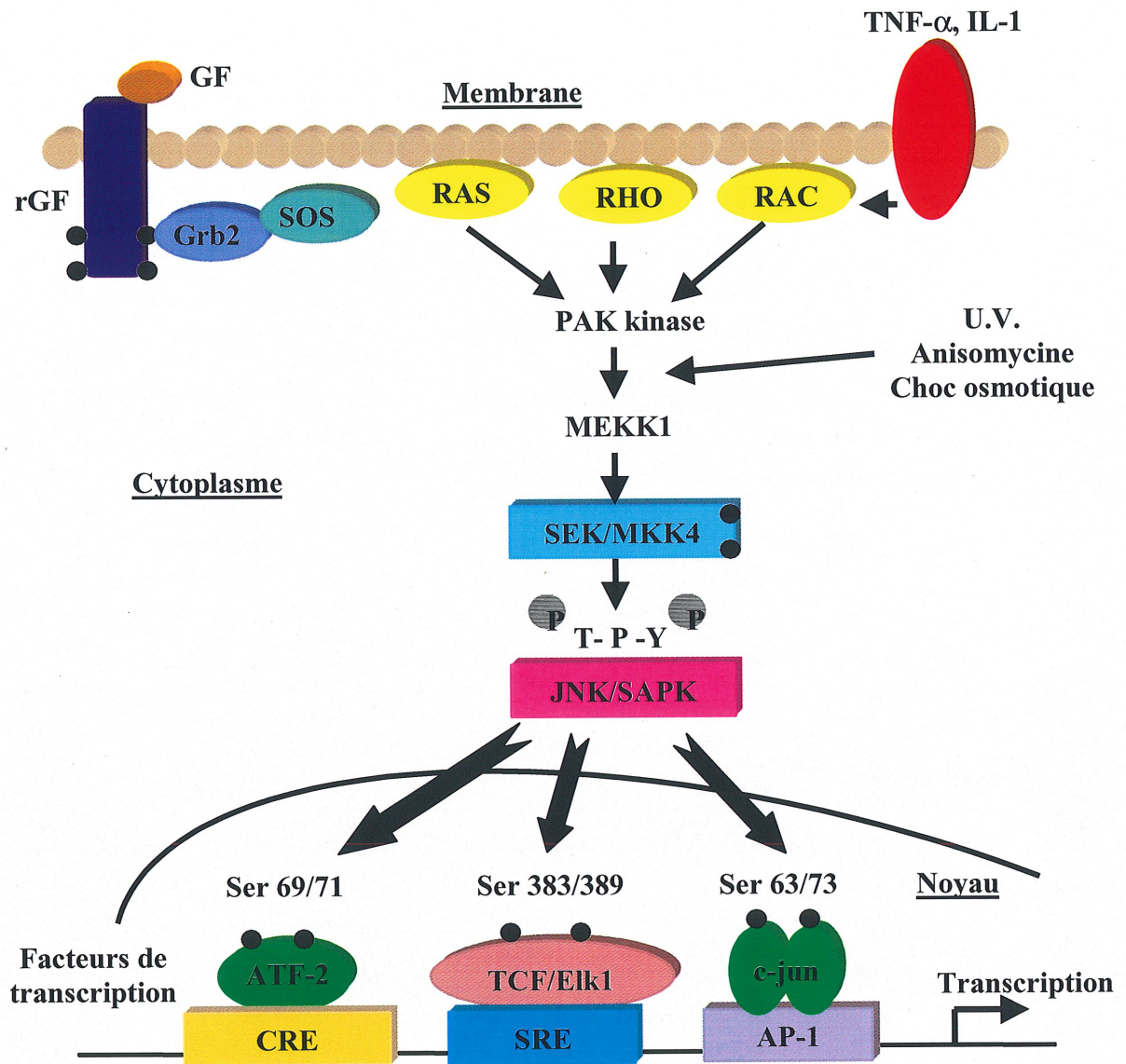
**Stimulations extracellulaires**



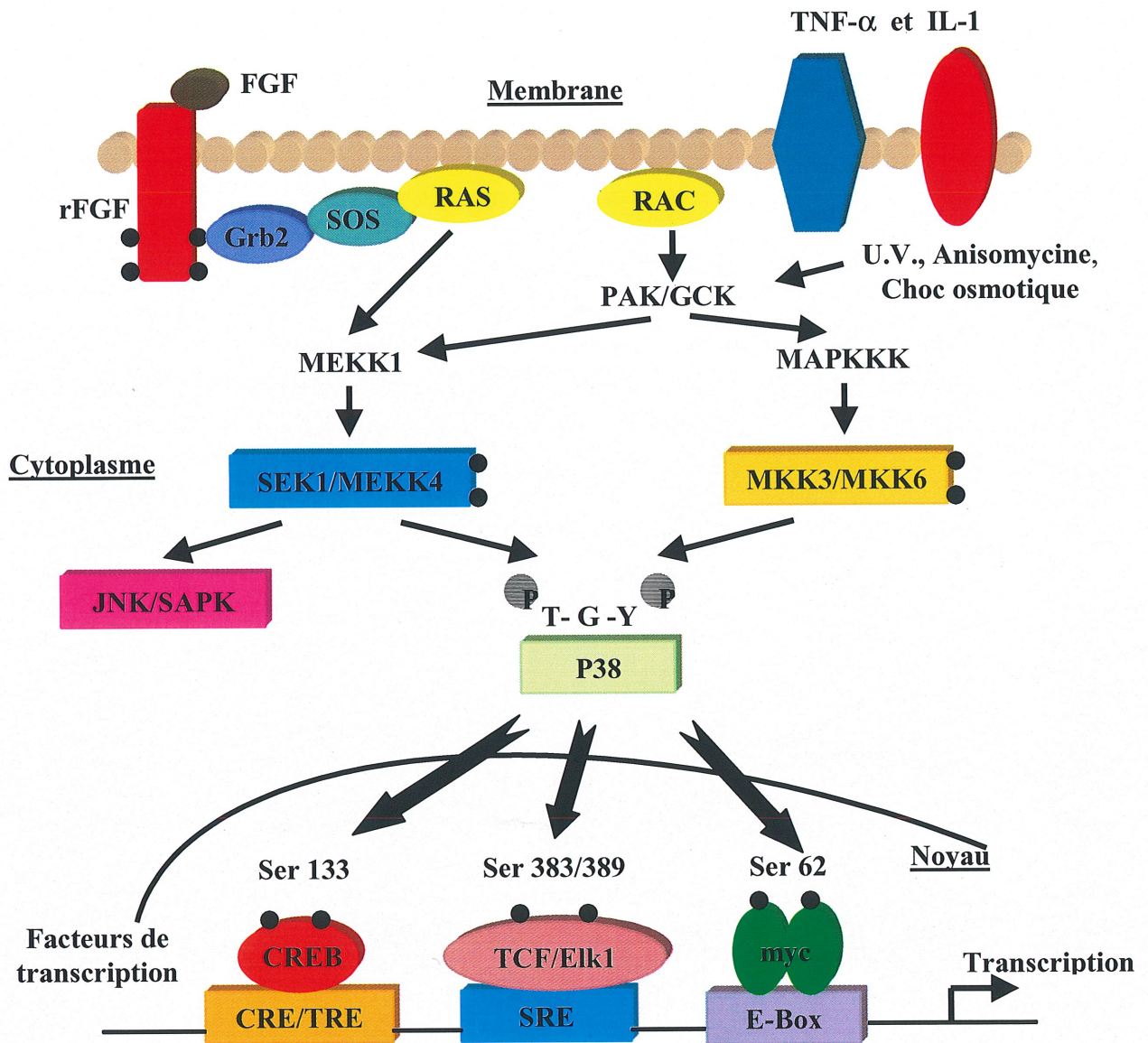
**Figure 9. Cascade des MAPKs chez les mammifères.**



**Figure 10. La voie des ERKs.** Cette voie consiste en une cascade séquentielle de protéines kinases permettant d'induire la prolifération et la différenciation cellulaire suivant l'expression de gènes particuliers. Les récepteurs à facteurs de croissance (rFGF), lorsqu'activés par leur ligand respectif (FGF), vont favoriser l'activation de la protéine Ras, laquelle à son tour active c-Raf, MEK et ERK1/2. Cette dernière est par la suite transloquée au noyau dans le but d'activer par phosphorylation divers facteurs de transcription tels que Stat3 et Elk-1. Les points noirs représentent quelques sites de phosphorylation.



**Figure 11. La voie des JNKs.** Une variété de stimulations extracellulaires dont la lumière U.V., les cytokines inflammatoires, divers stress osmotiques, etc., ont la capacité d'induire l'activation de la voie des JNKs. Cette dernière est impliquée dans les processus d'inhibition de croissance et d'apoptose. Les cytokines inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et IL-1 semblent activer cette voie par l'entremise de la famille des petites GTPases Rac/Rho alors que l'anisomycine (inhibiteur de la synthèse protéique), les U.V. ainsi que les chocs osmotiques agissent indépendamment des ces GTPases. MEKK1 éventuellement activée phosphoryle SEK1, laquelle à son tour active JNK. JNK est ensuite transloquée au noyau. Elle active certains facteurs de transcription tels que ATF-2 et c-jun, pour y réguler l'expression de gènes particuliers.

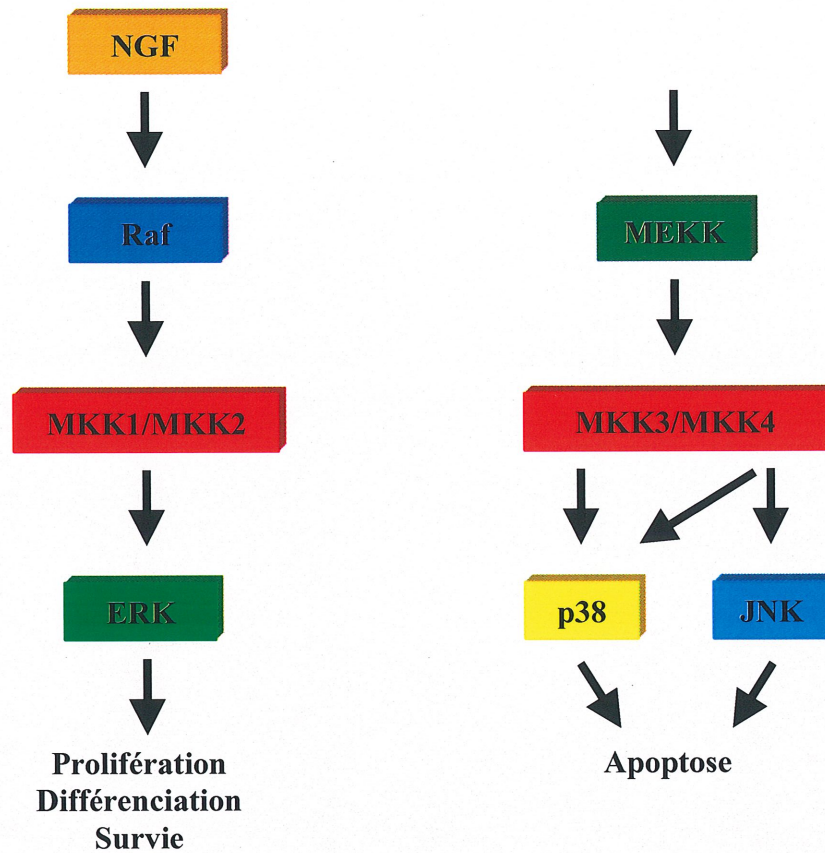


**Figure 12. La voie de p38.** Cette voie peut être activée à la fois par une variété de stress telle que la lumière U.V., les cytokines inflammatoires (TNF- $\alpha$  et IL-1), les chocs osmotiques ainsi que par divers facteurs de croissance (FGF). Dans tous les cas, il y a activation de p38 par les différents membres de la famille SEK. Cette famille comporte, entre autres, MKK4, laquelle peut également induire l'activation de la voie des JNKs, MKK3 et MKK6. P38 ainsi activée peut alors être transloquée au noyau dans le but de phosphoryler et d'activer plusieurs facteurs de transcription dont Elk-1 et myc.

phosphorylation peuvent être induites suivant la mobilisation du stimulus par d'autres molécules impliquées dans la signalisation telles que les isoformes de la protéine kinase C (PKC), les phospholipides kinases, les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta\gamma$  des protéines G, les phospholipases, etc (Denhardt, 1996). Ces dernières peuvent avoir un impact sur plusieurs effecteurs en aval appartenant à différentes voies de transduction. Ceci semble paradoxal puisque chaque voie semble induire une réponse cellulaire qui lui est propre. En effet, contrairement à l'activation de la voie des JNKs qui conduit préférentiellement à l'arrêt de la croissance ou à l'apoptose, la cascade des ERKs stimule la prolifération et la différenciation cellulaire. Or, le fait de stimuler différentes voies de transduction peut sembler difficile quant à la détermination du destin de la cellule. En fait, l'implication simultanée de plusieurs cascades de signalisation traduit le coeur d'un concept nouvellement établi. Ces activations multiples permettraient le chevauchement entre les différentes voies pour assurer le renforcement ou l'atténuation du signal transmis (Denhardt, 1996). Voilà pourquoi la PKC par exemple, peut être impliquée dans une variété de réponses cellulaires suivant sa stimulation par le phorbol ester, telles que l'activation mitogénique et l'inhibition de la prolifération accompagnée d'une différenciation cellulaire concomitante (Clemens *et al.*, 1992). Ce concept permet également d'expliquer la raison d'être des différents niveaux successifs qui traduisent le cheminement du signal vers le noyau. Ces cascades séquentielles permettraient l'augmentation de la stabilité du signal; la contribution de chaque membre serait importante sans toutefois être critique pour qu'il y est transmission (Denhardt, 1996). De façon générale, dans une cellule saine en condition normale (aucune perturbation), les différentes voies fonctionnent à un taux basal et semblent se contrebalancer les unes avec les autres afin d'assurer l'état homéostatique. Une simple perturbation quelle qu'elle soit, modifie cet équilibre conduisant alors la cellule vers les processus de prolifération, de différenciation cellulaire, d'inhibition de croissance ou d'apoptose (Denhardt, 1996; Paul *et al.*, 1997). Par exemple, une étude a démontré que l'activation des voies de signalisation de JNK et p38, suite à l'enlèvement du NGF, était nécessaire mais non suffisante pour induire l'apoptose des cellules PC12. En effet, l'addition du NGF permet la survie de ces cellules puisqu'il entraîne l'activation de la voie Ras  $\rightarrow$  Raf  $\rightarrow$  MKK1/2  $\rightarrow$  ERK. Or, ils ont montré

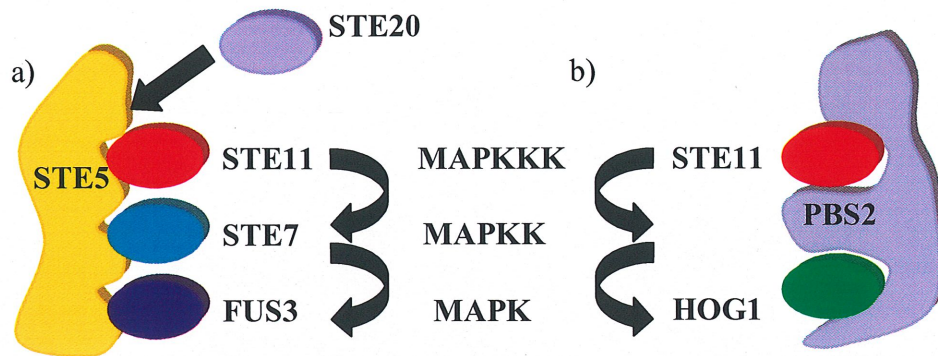
que cette privation occasionnait non seulement l'activation de JNK et de p38 mais aussi l'inactivation de ERK. Ainsi, il semblerait qu'une plus grande quantité d'activité ERK comparativement à celles de JNK et p38 favoriserait la survie des cellules, alors que l'inverse assurerait l'induction du processus d'apoptose (Figure 13) (Xia *et al.*, 1995; Denhardt, 1996; Jarpe *et al.*, 1998; Madhani et Fink, 1998). L'effet net d'une stimulation donnée est donc le résultat d'une intégration complexe de l'intensité et de la durée du processus d'activation de chaque voie de transduction prise individuellement (Robinson et Cobb, 1997; Jarpe *et al.*, 1998). Le destin de la cellule dépend donc du facteur extracellulaire libéré par le cellule émettrice, des différentes protéines impliquées dans la transmission du signal qui sont exprimées dans la cellule cible et de la dynamique qui unit les différentes voies pour rétablir l'équilibre.

Toutefois, ce concept ne permet pas totalement d'expliquer la rapidité, la spécificité de même que la sélectivité de la réponse compte tenu du fait que certaines kinases, au sein de leur organisation, peuvent être partagées parmi les différentes voies de signalisation. La levure semble pourtant avoir résolu ce problème par l'utilisation des protéines Ste5 et Pbs2, des adaptateurs non enzymatiques ("scaffold protein") capables de former des complexes multiprotéiques avec certaines kinases (Ste11, Ste20 et Ste7), lesquelles étant partagées parmi plusieurs voies de signalisation indépendantes (Figure 14) (Choi *et al.*, 1994; Elion, 1998; Madhani et Fink, 1998; Schaeffer *et al.*, 1998). La formation de ce complexe, également appelé transducisome, viendrait compromettre le chevauchement de ces voies tout en assurant la sélection des différents effecteurs nécessaires au bon dénouement. Il favoriserait de plus, la rapidité du transfert à travers la cascade en facilitant la phosphorylation successive des divers membres associés à ce même complexe (Faux et Scott, 1996; Whitmarsh *et al.*, 1998; Whitmarsh et Davis, 1998). En fait, il s'agit simplement d'une organisation subcellulaire des différentes sérine/thréonine kinases en un complexe multiprotéique similaire à celui observé au niveau de la membrane plasmique lors du processus d'activation des récepteurs, et au sein duquel on retrouve des protéines dites adaptateurs. Ces dernières, étant elles-mêmes localisées



**Figure 13. Modèle établissant les rôles de la voie des JNKs et des ERKs dans l'induction du processus d'apoptose.** En présence de NGF, la survie des cellules est assurée à la fois grâce à l'activation de la voie des ERKs et à la suppression de JNK et p38. Sans NGF, il y a désactivation de la voie des ERKs et le processus d'apoptose s'enclenche.

à des endroits stratégiques dans la cellule, auraient pour rôle la compartimentalisation de certaines kinases particulières au niveau de leur site d'action. Cette relocalisation serait nécessaire pour assurer leurs fonctions physiologiques (Mochly-Rosen, 1995; Pawson et Scott, 1995; Tsunoda *et al.*, 1998).



**Figure 14. Complexes multiprotéiques chez la levure.** (a) Fixation des protéine Ste11, Ste7 et Fus3 à Ste5. (b) Interaction des protéines Ste11 et HOG1 à la protéine Pbs2.

Cette découverte a poussé la communauté scientifique à se tourner vers l'identification de protéines analogues chez les cellules de mammifère. Récemment, 2 protéines ont été identifiées par le système des deux hybrides, soit JIP-1 et MP1, oeuvrant respectivement au sein de la voie des JNKs et des ERKs (Figure 15) (Elion, 1998; Schaeffer *et al.*, 1998; Whitmarsh *et al.*, 1998). JIP-1 a initialement été caractérisée en tant qu'inhibiteur de la voie des JNKs de par sa capacité à séquestrer JNK dans le cytoplasme lorsqu'elle est surexprimée. Cette séquestration prévenait dès lors l'expression de gènes particuliers normalement modulés suivant l'activation de cette voie de transduction. Toutefois, une caractérisation plus approfondie de cette protéine a révélé son habileté à interagir spécifiquement avec divers composants appartenant tous à la voie des JNKs soit MLK3 (MAPKKK), ZPK/DLK/MUK (MAPKKK), MKK7 (MAPKK) et JNK (MAPK). Il semblerait cependant que JIP-1 induit l'activation de JNK par MLK3 et MKK7. Aucune expérimentation n'a jusqu'à maintenant confirmé l'activation de JNK par ZPK malgré le fait qu'elle puisse interagir avec JIP-1 (Whitmarsh *et al.*, 1998; Whitmarsh et Davis, 1998). JIP-1 constitue donc une "scaffold protein" similaire à Ste5 en ce sens qu'elle dirige une voie de signalisation dans sa totalité puisqu'elle interagit avec un représentant de chaque niveau successif (Elion, 1998). Ces différents représentants vont ensuite occasionner la phosphorylation de JIP-1 et Ste5 suivant

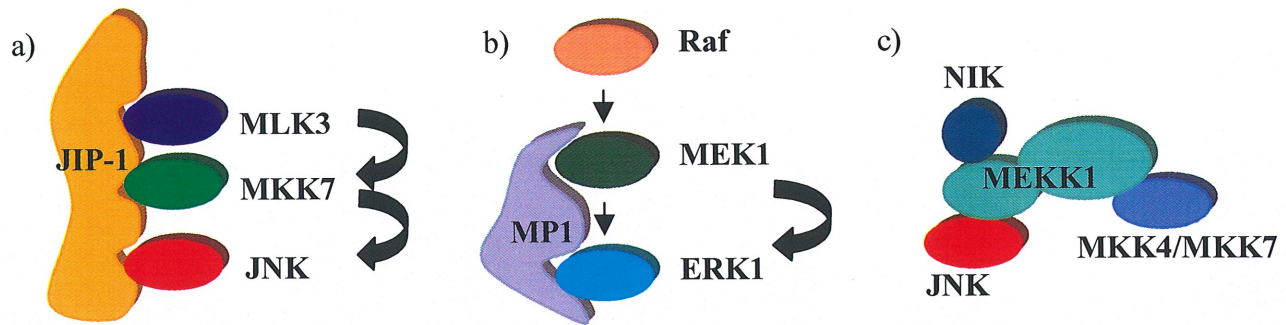


leur association. La signification de cette phosphorylation n'a cependant pas encore été éclaircie (Whitmarsh et Davis, 1998).

Contrairement à JIP-1, MP1 appartient à un second groupe de "scaffold protein" puisqu'elle ne fixe que MEK1 (MAPKK) et ERK1 (MAPK), facilitant ainsi leur activation. Cette interaction permet uniquement la détermination d'une destination finale ce qui laisse présupposer l'implication de d'autres "scaffold protein" situées en amont (Elion, 1998; Schaeffer *et al.*, 1998).

Outre ces adaptateurs non enzymatiques, il semblerait que certaines kinases exerçant un rôle au sein des diverses voies de transduction, puissent également jouer ce rôle d'adaptateur. MEKK1 est l'un de ces candidats (Figure 15) (Elion, 1998; Whitmarsh et Davis, 1998). En effet, sa région amino-terminale peut s'associer à la fois à NIK (MAPKKK) et JNK (MAPK). NIK peut à son tour interagir avec NCK, une protéine cible de divers récepteurs à facteurs de croissance au même titre que Grb2, permettant ainsi de lier les récepteurs localisés à la surface cellulaire à la voie des JNKs (Su *et al.*, 1997). De plus la portion carboxy-terminale de MEKK1 interagit également avec MKK4/MKK7 tous deux impliqués dans l'activation de la voie des JNKs (Whitmarsh et Davis, 1998).

En somme, il existe une multitude de façon pour assurer la rapidité, la spécificité et la sélectivité des diverses protéines kinases au sein du processus de transduction des signaux. Outre le concept de chevauchement des voies, la cellule utilise trois types de protéines : des protéines accessoires qui régulent directement l'activité d'une protéine kinase et/ou sa localisation



**Figure 15. Complexes multiprotéiques chez les mammifères.** (a) Association des protéines kinases MLK3, MKK7 et JNK à JIP-1, ce qui facilite leur activation successive. (b) Association de MEK1 et ERK1 à MP1. (c) Interaction des protéines NIK et JNK avec la portion amino terminale de MEKK1 et association des protéines MKK4/MKK7 dans la région carboxy terminale de MEKK1.

(les sous-unités de la protéine kinase A), des protéines adaptateurs qui associent la protéine kinase à son régulateur et/ou son substrat (une protéine ayant des domaines SH2/SH3 qui relie un récepteur à ses effecteurs situés en aval) et des protéines régulatrices qui permettent d'associer un groupe de protéines kinases fonctionnant séquentiellement dans la même cascade (JIP-1, MP1, Ste5) (Choi *et al.*, 1994). L'intégration complexe de ces divers mécanismes assure une certaine flexibilité dans la régulation du processus de signalisation et permet ainsi d'éviter d'innombrables désordres physiologiques importants (Choi *et al.*, 1994).

### La famille des MLKs

La famille des MLKs (mixed-lineage kinases), une nouvelle famille de protéines kinases, comporte plusieurs membres dont MLK1 (Dorow *et al.*, 1993), MLK2/MST (Dorow *et al.*, 1993), MLK3/SPRK/PTK1 (Ezoe *et al.*, 1994; Gallo *et al.*, 1994; Ing *et al.*, 1994), ZPK/DLK/MUK (Beaudoin *et al.*, 1994; Holzman *et al.*, 1994; Hirai *et al.*, 1996; Reddy and Pleasure, 1994) et LZK (Sakuma *et al.*, 1997), lesquels étant tous caractérisés par un domaine

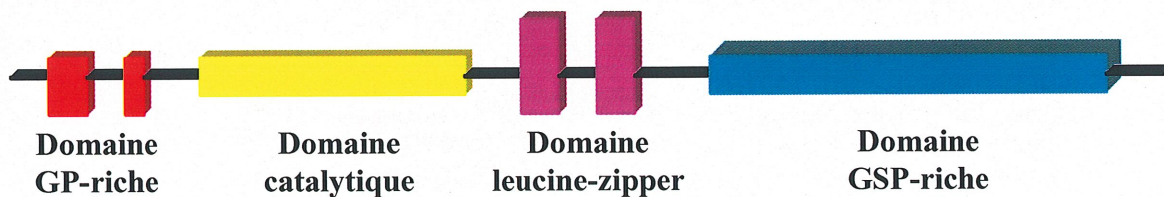
catalytique distinct. En effet, ce dernier possède certaines caractéristiques des deux types d'activité kinase, puisqu'il contient à la fois plusieurs motifs conservés généralement associés aux sérine/thréonine kinases et aux tyrosine kinases. Cependant, seule leur activité sérine/thréonine kinase n'a, jusqu'à maintenant, pu être démontrée en laboratoire (Fanger *et al.*, 1997). La seconde particularité qui distingue les membres de la famille des MLKs constitue la présence d'un double domaine leucine/isoleucine zipper séparé par une courte séquence de 13 à 27 acides aminés. Ces motifs suggèrent la possibilité que ces protéines seraient aptes à former des complexes homodimériques ou hétérodimériques analogues à ceux observés chez de nombreux facteurs de transcription (Landschulz *et al.*, 1988). De récentes études ont démontré que la dimérisation de MLK3 via son domaine leucine-zipper était un prérequis nécessaire à son autophosphorylation et par le fait même essentielle à son activation (Leung et Lassam, 1998). Tous les membres de la famille des MLKs possèdent également plusieurs régions riches en prolines situées de part et d'autre du domaine catalytique, lesquels étant susceptibles d'être la cible de nombreux ligands SH3 (Fanger *et al.*, 1997). Toutefois, contrairement à ZPK/DLK/MUK et LZK, seuls MLK1, MLK2 et MLK3 possèdent un motif SH3 dans la portion NH<sub>2</sub>-terminale (Fanger *et al.*, 1997). De plus, outre MLK1 et LZK, les autres membres de cette famille de protéines kinases possèdent également un domaine CRIB ("Cdc42/Rac interactive binding motif") leur permettant de s'associer à Rac1/Cdc42, des GTPases impliquées dans l'activation de la voie des JNKs (Teramoto *et al.*, 1996). Cependant, en dépit du fait que ZPK/DLK/MUK soit incapable d'interagir avec ces GTPases, cette protéine comporte effectivement un domaine CRIB caractérisé uniquement par 3 résidus conservés sur une possibilité de 8 (Burbelo *et al.*, 1995; Fanger *et al.*, 1997).

Malgré le fait que ces membres appartiennent tous à la même famille de protéines kinases, ils ont été subdivisés en deux sous-groupes en vertu d'une inspection plus approfondie de leur séquence en acides aminés (Holzman *et al.*, 1994; Sakuma *et al.*, 1997). En effet, environ 40% de la séquence correspondant à la fois au domaine catalytique et au domaine leucine-zipper de ZPK/DLK/MUK est similaire à MLK1, MLK2 et MLK3, alors que 86,4% de cette même séquence concorde avec celle de LZK (Sakuma *et al.*, 1997).

Ainsi, on a donc regroupé MLK1, MLK2 et MLK3 en tant que premier sous-groupe de la famille des MLKs, alors que ZPK/DLK/MUK et LZK forment le second sous-groupe.

### ZPK/DLK/MUK

La protéine ZPK/DLK/MUK, un membre de la famille des MLKs, a été identifiée à la fois chez la souris (DLK) (Holzman *et al.*, 1994; Beaudoin *et al.*, 1994), le rat (MUK) (Hirai *et al.*, 1996) et l'humain (ZPK) (Reddy and Pleasure, 1994) par quatre groupes de recherche indépendants. Ces protéines analogues issues d'espèces variées, démontrent sur l'ensemble de leur séquence 95% d'homologie. Ce haut pourcentage permet de suggérer l'importance que pourrait jouer cette kinase au sein de l'organisme, compte tenu de fait qu'elle se soit hautement conservée à travers l'évolution (Blouin *et al.*, 1996). ZPK possède, comme il a été mentionné auparavant, de nombreux motifs caractéristiques de la famille des MLKs et dont la séquence primaire est illustrée à la Figure 16.



**Figure 16. Représentation schématique de la séquence primaire de ZPK.** GP représente un domaine riche en glycine-proline et GSP un domaine riche en glycine-sérine-proline. Le domaine leucine-zipper comporte deux motifs séparés par une séquence de 25 acides aminés. Le domaine catalytique est composé de diverses caractéristiques propres aux sérine/thréonine kinases et aux tyrosine kinases.

La protéine kinase ZPK, au même titre que d'innombrables protéines nouvellement identifiées, est uniquement caractérisée de façon préliminaire et son rôle physiologique

demeure à ce jour inconnu. Cependant, depuis sa découverte, plusieurs évidences permettent de dresser un tableau relatant ses diverses implications au sein des différents processus cellulaires qui régissent l'organisme supérieur. À prime abord, plusieurs études d'expression réalisées chez la souris semblent démontrer une distribution tissu-spécifique de l'ARNm de ZPK (Reddy and Pleasure, 1994; Holzman *et al.*, 1994; Blouin *et al.*, 1996). Les ARNms résultant de la transcription du gène ZPK, sont principalement localisés au niveau du cerveau et certains organes embryonnaires nécessitant des interactions épithélio-mésenchymateuses pour leur développement tels que la peau, l'intestin, le pancréas et les reins (Nadeau *et al.*, 1997). Les cellules qui l'expriment fortement sont différenciées ou en voie de différenciation terminale ce qui suggère l'implication possible de ZPK dans l'établissement et/ou le maintien de l'état différencié chez une variété de lignées cellulaires (Nadeau *et al.*, 1997). Il est également concevable que ZPK puisse participer au processus de différenciation cellulaire par l'entremise d'une régulation négative de la croissance (Bergeron *et al.*, 1997). Une étude réalisée dans notre laboratoire a démontré que la surexpression de ZPK dans des fibroblastes de souris (NIH 3T3) occasionnait inévitablement l'arrêt de la prolifération cellulaire d'une manière dépendante de son activité (Bergeron *et al.*, 1997). Son implication dans la régénération du foie constitue un second exemple relatant le rôle possible de ZPK dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire (Douziech *et al.*, 1998). En effet, la capacité du foie à se régénérer suite à des blessures infligées soit par hépatectomie partielle soit par intoxication chimique, constitue un modèle *in vivo* permettant d'étudier les différents mécanismes impliqués dans le contrôle de ces processus physiologiques. Cette expérimentation a démontré l'existence d'une corrélation entre la distribution hétérogène des ARNms de ZPK et la variation zonale de l'activité proliférative des hépatocytes qui se produit 24 heures après l'hépatectomie. En effet, nous avons localisé ZPK dans la zone péricentrale d'un lobule hépatique, laquelle étant constituée d'hépatocytes affichant un retard au niveau de leur entrée en phase réplivative. Ce résultat suggère la possibilité que ZPK agisse en tant qu'inhibiteur de la prolifération dans le but de maintenir l'état différencié des cellules qui l'exprime et ce afin d'assurer continuellement la fonction de l'organe en régénération (Douziech *et al.*, 1998). Cette induction transitoire de l'expression du gène ZPK chez les

sous-populations d'hépatocytes serait l'un des événements séquentiels de signalisation permettant ou non la prolifération cellulaire au cours du processus de régénération.

Plusieurs groupes de recherche ont ensuite tenté d'identifier quelle voie de signalisation au sein de la cascade des MAPKs, était activée par la protéine kinase ZPK (Fan *et al.*, 1996; Hirai *et al.*, 1996). Ceux-ci ont mis en évidence sa capacité à induire l'activation de la voie des JNKs et de p38, au même titre que MLK2 ( Hirai *et al.*, 1995; Cuenda et Dorow, 1998; Hirai *et al.*, 1998; Nagata *et al.*, 1998) et MLK3 (Kiefer *et al.*, 1996; Rana *et al.*, 1996; Tibbles *et al.*, 1996; Teramoto *et al.*, 1996), possiblement par l'entremise de SEK1/MKK4, une MAPKK (Figure 9). Ces voies, préférentiellement activées par des cytokines inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) et une variété de stress (choc thermique, l'hyperosmolarité et la lumière UV), sont impliquées, entre autres, dans la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose (Kyriakis et Avruch, 1996; Paul *et al.*, 1997).

Outre ces études d'expression et d'activation, Mata (1996) a démontré l'importance de la compartimentalisation subcellulaire de la protéine ZPK/DLK/MUK dans l'établissement de son état de phosphorylation. Cette compartimentalisation constitue un mécanisme cellulaire fréquemment utilisé au sein des protéines kinases puisqu'il permet une spécificité tant au niveau de la régulation que de l'action générée par ces enzymes. Plusieurs expérimentations ont permis de confirmer, grâce à des stimulations cellulaires, que la translocation de nombreuses protéines kinases en des endroits stratégiques où elles s'associent à des protéines adaptateurs, leur permettent d'avoir accès à leur substrat et ainsi accomplir leur fonction physiologique. Or, il semblerait que ZPK pourrait également procéder de cette façon (Mata *et al.*, 1996). Il a été démontré par fractionnement subcellulaire qu'elle pouvait non seulement se localiser tant au niveau des membranes que du cytosol, mais également qu'elle présentait différentes caractéristiques biochimiques dépendantes de sa localisation. Associé aux membranes, ZPK était non phosphorylé et homodimérique, caractérisé par un poids moléculaire de 260 Kda. Par contre, dans les fractions cytosoliques, ZPK était monomérique

et se présentait à la fois sous la forme phosphorylée et non phosphorylée. Ces résultats suggèrent donc la possibilité que cette translocation au niveau du cytosol serait requise à l'activation de la protéine ZPK. Cependant, nul ne sait par quels processus moléculaires cette protéine d'une part peut s'associer aux membranes, et d'autre part se relocaliser dans le cytoplasme.

### **Description du projet de Maîtrise**

Malgré l'ensemble des données expérimentales disponibles actuellement, la fonction physiologique de la protéine kinase ZPK reste encore inconnue. Nous croyons qu'elle est impliquée dans la régulation des processus de prolifération et de différenciation cellulaire. Afin d'éclaircir et d'apporter de nouvelles données quant au rôle qu'elle pourrait exercer *in vivo*, nous avons émis l'hypothèse de travail suivante : ZPK, de par le fait qu'elle comporte au sein de sa séquence primaire plusieurs régions riches en prolines analogues à celles reconnues par des ligands SH3, interagit avec différents partenaires protéiques spécifiques qui lui permettent d'une part, d'assurer sa localisation subcellulaire et d'autre part, d'exercer sa fonction au sein des différents processus cellulaires. La littérature offre plusieurs exemples relatant l'implication de telles interactions protéine-protéine dans la transmission des signaux perçus au niveau de la membrane en direction du noyau ainsi que dans la relocalisation de certaines enzymes pour qu'elles puissent exercer leur fonction caractéristique. L'objectif principal du projet de maîtrise était donc d'identifier, de purifier et de caractériser un partenaire protéique potentiel de ZPK. À cette fin, nous avons d'abord déterminé la localisation subcellulaire de la protéine ZPK afin d'obtenir des éclaircissements sur sa fonction biologique et peut-être même son mécanisme d'action. L'atteinte de ce premier objectif a nécessité l'utilisation de techniques de microscopie optique et électronique ainsi que différentes analyses biochimiques qui seront décrites ultérieurement.

Dans un deuxième temps, nous avons procédé à l'identification d'un partenaire au moyen d'une technique d'analyse des interactions protéine-protéine appelée Far Western. À cette fin, des extraits membranaires fixés sur une membrane de PVDF ont été incubés en présence de la région riche en prolines de ZPK fusionnée à la glutathione S-transférase. Cette protéine de fusion a également été utilisée lors d'expériences de chromatographie d'affinité nécessaire à la purification d'un partenaire potentiel de ZPK.



# CHAPITRE 1

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1.1 Détermination de la localisation subcellulaire de la protéine ZPK

#### 1.1.1 Culture cellulaire

La lignée de cellules NIH 3T3 a été maintenue en culture dans le milieu "Dulbecco's Modified Eagle Medium" (DMEM, Gibco BRL, États-Unis) comprenant à la fois 10% de sérum de bovin foetal (FBS, Gibco BRL, États-Unis), 100U/ml de pénicilline, 100µg/ml de streptomycine et 25µg/ml d'amphotéricine B (Gibco BRL, États-Unis). Ces cellules ont été cultivés à 37°C sous une atmosphère de CO<sub>2</sub> à 5%.

#### 1.1.2 Immunohistochimie

L'analyse de la localisation subcellulaire de la protéine ZPK par microscopie optique a été réalisée grâce à la technique d'immunohistochimie. Les cellules ont d'abord été fixées pendant 2 minutes à la température de la pièce dans une solution 1:1 (v/v) de méthanol/acétone. Elles ont ensuite été incubées 30 minutes dans une solution de TBS-B (20mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween-20) contenant 1% BSA et 1% lait en poudre dans le but de bloquer les sites de liaison non spécifiques. En ce qui a trait aux réactions avec les anticorps, les cellules ont été incubées avec l'anti-ZPK (dilution 1:400) (Daigle, 1998) pendant 1 heure à la température de la pièce suivi par une seconde incubation d'également 1 heure avec un anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline (dilution

1:1000). Plusieurs étapes de lavage ont été effectuées avec les tampons TBS-B (3 fois 5 minutes) et Tris-HCl pH 9.5 (100mM Tris-HCl, pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub> et 1mM levamisole) (3 fois 5 minutes) après quoi l'activité de cette phosphatase alcaline a été visualisée suivant sa réaction avec ses substrats, soit le NBT et le x-phosphate (Boehringer Mannheim, Canada) eux-mêmes dilués dans la solution de Tris-HCl pH 9.5. Finalement, les cellules ont été observées puis photographiées sous illumination "bright-field" à l'aide d'un photomicroscope Zeiss et de films T-Max 100 de Kodak. En ce qui a trait aux expérimentations réalisées pour la microscopie électronique, les cellules NIH 3T3, cultivées dans des pétris de 35mm, ont été fixées à la température de la pièce avec une solution de paraformaldéhyde-lysine périodate pendant une période de 4 heures. Ces cellules ont par la suite subi une étape de perméabilisation à l'aide de la saponine pour ensuite être soumises à une immunohistochimie telle que décrite précédemment à l'aide de l'anti-ZPK (dilution 1:400) et d'un anticorps secondaire couplé cette fois-ci à une peroxydase (dilution 1:200, Sigma, Canada). Suivant la révélation de l'activité peroxydase avec la diaminobenzidine et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les cellules ont alors été fixées dans de la glutaraldéhyde suivi d'une fixation au tétroxyde d'osmium réduit avant de procéder à la déshydratation ainsi qu'au scellage dans l'Epon. Des sections de 70 nm ont été préparées puis colorées au nitrate de plomb. Les microphotographies ont été prises sur un microscope électronique Philips 201.

### 1.1.3 Fractionnement subcellulaire

Le fractionnement subcellulaire a été réalisé grâce à l'utilisation d'un gradient de Percoll (Pharmacia Biotech, Canada) (Morand et Kent, 1986). Environ  $5 \times 10^7$  de cellules NIH 3T3 ont été resuspendues dans un tampon TS froid (10mM Tris-HCl, pH 7.4, 250mM sucrose, 1mM PMSF, 1µg/ml leupeptine et 1µg/ml aprotinine) pour être homogénéisées à l'aide d'un homogénéisateur de type B (environ 20 strokes). L'homogénat a alors été traité avec 75U/ml de DNase I (Pharmacia Biotech, Canada) pendant 30 minutes à 37°C. Cette préparation a été déposée sur le dessus d'une solution de Percoll à 13.5% préparée dans le

tampon TS et centrifugée à 17 000 rpm pendant 1 heure à l'aide du rotor 50 Ti de la compagnie Beckman (Canada). Des fractions de 1ml ont été récupérées (à partir du dessus du gradient) puis dosées par Bradford (Bio-Rad Laboratories, États-Unis). Des quantités égales de protéines appartenant à chacune des fractions ont été précipitées suivant la méthode de Wessel et Flügge (1984) et analysées par immunobuvardage en utilisant un anticorps dirigé soit contre ZPK (1:1000), soit contre la  $\alpha$ -mannosidase II (1:2000, gracieuseté du Dr. K.W. Moreman, University of Georgia). Un anticorps dirigé contre la sous-unité  $\beta$  des protéines G (1:1000, Chemicon International Inc., Canada) a également été utilisé lors de cette expérimentation, en tant que marqueur spécifique des membranes plasmiques.

#### **1.1.4 Immunobuvardage**

Suivant la migration, le gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) a été transféré sur une membrane de PVDF (Boehringer Mannheim, Canada) selon la méthode recommandée par le manufacturier de l'appareil à transfert "semi-dry" (Hoefer Scientific Instrument, États-Unis). À prime abord, le gel a été incubé dans une solution TB (5.81g Tris base, 2.93g glycine, 0.375g SDS et 200ml méthanol par litre de solution) en vue de réaliser le transfert semi-sec. La membrane, quant à elle, à d'abord été traitée 5 secondes dans du méthanol 100% pour ensuite être transférée dans de l'eau distillée. Elle a ainsi été incubée durant 5 minutes avec agitation légère puis elle a été plongée dans la solution TB durant 10 à 15 minutes. La procédure nécessaire à la réalisation du montage requis au transfert efficace des protéines a été effectuée selon les instructions également fournies avec l'appareil à transfert semi-sec. Suivant ce transfert, la membrane a été bloquée toute la nuit à 4°C dans une solution de TBS-T (20mM Tris HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween-20) contenant 5% de lait en poudre. La réaction de l'anticorps primaire a été effectuée pendant 1 heure. Le second anticorps (Amersham, Canada), un anti-lapin fait chez l'âne, a été utilisé à une dilution de 1:10 000 également pendant 1 heure. Ce dernier était couplé à une peroxydase nécessaire à la détection de la réaction par chemiluminescence (ECL+) (Amersham, Canada). Cette enzyme a permis

de catalyser l'oxydation du substrat ce qui a occasionné la production d'une chemiluminescence à haute intensité détectable par autoradiographie suivant la procédure recommandée par le manufacturier.

### **1.1.5 Extraction membranaire**

Certaines manipulations décrites ci-dessous ont été réalisées en collaboration avec Gino Laberge. Les cellules NIH 3T3 ont été homogénéisées à l'aide d'un homogénéisateur de type B dans une solution de 250mM sucrose, 10mM Tris-HCl, pH 7.5, 2mM EDTA, 1mM PMSF, 2µg/ml leupeptine et 1µg/ml aprotinine. L'homogénat a été centrifugé à 600g pendant 3 minutes à 4°C dans une microfuge de façon à sédimenter les noyaux et les débris cellulaires. Le surnageant ainsi obtenu a été ultracentrifugé à 100 000g pendant 1 heure à 4°C à l'aide du rotor SW 50.1 de Beckman (Canada). Le culot, composé de fractions membranaires, a été resuspendu dans un tampon d'homogénéisation contenant soit 1M NaCl, 1M KCl ou 0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 11.5. Après incubation d'une durée de 30 minutes sur la glace, les échantillons ont été centrifugés à nouveau à 100 000g pendant 30 minutes afin d'obtenir les surnageants et les culots de membranes. L'extraction des fractions membranaires au Triton X-114 a été réalisée quant à elle, selon la méthode décrite par Bordier (1981). Cette dernière permet d'obtenir, après plusieurs centrifugations à la température de la pièce, une phase aqueuse ainsi qu'une phase détergent, laquelle ne comporte que les protéines caractérisées soit par un domaine transmembranaire, soit par une ancre lipidique. Les surnageants et les culots des différents traitements de même que les phases aqueuse et détergent issues de l'extraction au Triton X-114 ont été soumis à une analyse sur gel SDS-PAGE suivi d'un immunobuvardage à l'aide de l'anti-ZPK.

### 1.1.6 Traitement à la trypsine de membranes intactes ou perméabilisées au Triton

Cette expérimentation a également été réalisée en collaboration avec Gino Laberge. Des fractions membranaires préparées telles que décrites à la section 1.1.5 ont été resuspendues dans un tampon de digestion (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl) avec ou sans Triton X-100 à une concentration finale de 1%. Après une période d'incubation de 5 minutes sur glace, 0.1µg/ml de trypsine a été ajouté pour ensuite procéder à la digestion à 4°C pendant 20 minutes. Des inhibiteurs de protéases (2mM PMSF, 20µg/ml leupeptine et 20µg/ml d'aprotinine) ont été ajoutés afin de neutraliser la trypsine. Les membranes ont été diluées avec un volume égal de tampon de digestion contenant soit 1% Triton X-100, soit 2% Triton X-100. Après 30 minutes d'incubation à 4°C, les échantillons ont été centrifugés à 12 000 rpm dans une microfuge pour une période de 15 minutes. Les surnageants ont alors été immunoprécipités à 4°C pendant 3 heures avec agitation constante en présence de protéine A-agarose (Boehringer Mannheim, Canada) et de l'anti-ZPK ( dilution 1:250) ou de l'anti-mannosidase II (dilution 1:500). À la fin de cette période d'incubation, les immunocomplexes ont été récupérés par centrifugation à 12 000 rpm durant 30 secondes pour ensuite être lavés 2 fois avec le tampon de digestion contenant 1% Triton X-100. Le culot final a été resuspendu dans un tampon d'échantillon 2X (2% SDS, 1.4M β-mercaptoéthanol, 100mM Tris-HCL, pH 6.8, 20% glycérol, 0.01% bromophénol bleu), chauffé 5 minutes à 95°C et chargé sur gel SDS-PAGE. ZPK ainsi que la mannosidase II ont été détectés par immunobuvardage selon la méthode décrite précédemment (section 1.1.4).

## 1.2 Préparation de l'ADN recombinant

### 1.2.1 Amplification, purification et clonage de la région riche en prolines de ZPK murin par PCR

La région riche en prolines située dans la portion amino-terminale de ZPK (les acides aminés 1 à 200) a été amplifiée par polymérisation en cascade (PCR) à l'aide d'amorces oligonucléotidiques (Gibco BRL, États-Unis) spécifiques et du phagemide Bluescript® KS (+) contenant l'ADNc de ZPK. La séquence de ces amorces, désignée respectivement RRP1-5' (TCCCCCGGGGGACATGGCCTGCCTCCATGAA) et RRP1-3' (TAGTTCGTAGAAG CTTTCCTTAAGG) est caractérisée par l'introduction des sites de restriction *Sma*I (amorce RRP1-5') et *Eco*RI (amorce RRP1-3') nécessaires au clonage éventuel du produit de l'amplification. Les séquences correspondant à ces sites de restriction sont écrites en caractères gras. Les bases soulignées de part et d'autre de ces sites ont été ajoutées de façon à conserver le cadre de lecture nécessaire à la synthèse de la protéine désirée.

La quantité d'ADN utilisée pour effectuer cette amplification était de 5 à 10µg/ml alors que celle des amorces était de 0.1µM/L chacune. 25 cycles ont été nécessaires à la réalisation de cette amplification. Ces cycles étaient caractérisés par une étape de dénaturation des brins d'ADN à 94°C pendant 1 minute suivi d'une étape d'hybridation des amorces à l'ADN durant 2 minutes à 45°C, pour ensuite poursuivre avec l'étape d'élongation qui a eu lieu quant à elle, à 72°C pendant 3 minutes. Une extension finale à 72°C pendant 10 minutes a été effectuée avant d'entamer la purification de cette amplification sur gel d'agarose "Low-Melting Point temperature" (LMP) (Gibco BRL, États-Unis).

À cette fin, la bande d'agarose à l'intérieur de laquelle se retrouvait l'ADN a été découpée le plus finement possible et estimée en terme de poids. Un volume de la solution TE (10mM tris-HCL, pH 8.0, 1mM EDTA) a été ajouté, la règle étant de 1ml /g d'agarose.

Par la suite, un volume de phénol pH 8.0 saturé au Tris a été ajouté au tube suivant la dissolution de l'agarose à 65°C pendant 5 à 10 minutes. La préparation d'ADN a été mélangée par inversion puis centrifugée 3 minutes à 13 000 rpm dans une microfuge elle-même à la température de la pièce. La phase aqueuse a été transférée dans un tube à microfuge pour subir à nouveau une seconde extraction au phénol. Suivant sa centrifugation, la phase aqueuse a été retransférée dans un tube contenant cette fois-ci 0.1 volume de LiCl 4M. Ce mélange a été incubé pendant 2 minutes sur la glace suivi d'une étape de centrifugation à 13 000 rpm durant 3 minutes. Le surnageant ainsi obtenu a été précipité avec 2.5 volume d'éthanol 100% durant 10 minutes à -70°C. L'ADN a ensuite été récupéré par centrifugation et resuspendu dans un volume de 10 à 20µl de TE.

Une fois purifié, ce fragment de 600pb a été digéré avec les enzymes *SmaI-EcoRI* selon les recommandations fournies par le fabricant (Promega, États-Unis), puis cloné dans le vecteur d'expression procaryote pGEX 2TK (Pharmacia Biotech, Canada) linéarisé avec les mêmes enzymes de restriction. Les tampons qui ont été utilisés étaient respectivement les tampons J (10mM tris-HCl, pH 7.5, 50mM KCl, 7mM MgCl<sub>2</sub> et 1mM DTT) et H (90mM tris-HCl, pH 7.5, 50mM NaCl et 10mM MgCl<sub>2</sub>) également fournis avec les enzymes de restriction *SmaI* et *EcoRI*. De façon générale, 1 à 5µg d'ADN a été digéré avec 10U/µl d'enzyme dans un volume final de 20 à 50µl. Une dilution de 1:10 du tampon correspondant à enzyme, a été utilisée. La réaction enzymatique a été effectuée pendant une période de 2 à 3 heures à 37°C. Après quoi les fragments d'ADN résultants ont été soit purifiés sur gel d'agarose LMP avant de subir une ligation vecteur/insert, soit simplement vérifiés sur gel d'agarose 1%.

Le protocole qui a permis la ligation entre les extrémités cohésives et/ou franches du vecteur pGEX 2TK à celles du produit de l'amplification, était celui fourni avec l'enzyme T4 DNA ligase de la compagnie Promega (États-Unis). Environ 100ng d'ADN correspondant au vecteur et 200 à 500ng correspondant à celui de l'insert ont été ligués en présence de 0.1 à 1U d'enzyme dans un volume final de 10µl. Le tampon ligase, qui a été utilisé à une

concentration de 1:10, était constitué de 30mM Tris-HCl, pH 7.8, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT et 1mM ATP. Cette réaction a été effectuée à 4°C pendant toute une nuit pour ensuite être transformée dans une souche d'*Escherichia coli*, les BL21 (Pharmacia Biotech, Canada), recommandée pour l'expression des protéines de fusion. Cette construction a aussi été transformée dans la souche d'*Escherichia coli* Top10 F' (Invitrogen, États-Unis) comme alternative au maintien du plasmide.

Le génotype de ces souches bactériennes d'*Escherichia coli* est:

BL21: F' *ompT gal [dcm] [lon] hsdS<sub>B</sub>* (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>; an E. coli B strain) avec DE3, un prophage λ portant le gène de la T7 RNA polymérase.

Top10 F': F' {*lacIq*, Tn10(*TetR*)} *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) *phi-80 lacZ*-Δ-M15 Δ-*lacX74 deoR recA1 ara*Δ139Δ-(*ara-leu*)7679 *galU galK rpsL(StrR) endA1 nupG*.

L'insertion du fragment amplifié dans ce vecteur, sous le contrôle du promoteur tac et de l'opéron lac, permet la production d'une protéine fusionnée à la glutathione S-transférase suivant l'ajout d'isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) (Promega, États-Unis) à la suspension bactérienne. Le vecteur pGEX 2TK contient un gène de résistance à l'ampicilline et une origine de répllication bactérienne (pBR322). Sa taille est de 4969pb, mais il atteint 5469pb suivant le clonage de la région riche en prolines de ZPK, laquelle compte 600pb.

### 1.2.2 Cellules compétentes et transformation cellulaire

Les cellules compétentes ont été produites selon le protocole établi par la compagnie Pharmacia Biotech (Canada). La transformation de ces cellules a quant elle, été effectuée selon Maniatis (1982).



### **1.2.3 Minipréparation de l'ADN plasmidique par lyse alcaline**

La méthode classique qui a été suivie pour réaliser cette expérience était celle de Maniatis (1982). Les préparations d'ADN ainsi obtenues ont ensuite été analysées sur gel d'agarose 1% suivant leur digestion double avec les enzymes de restriction *SmaI* et *EcoRI* (Promega, États-Unis).

### **1.2.4 Détermination de la séquence**

Pour être en mesure de vérifier la validité du cadre de lecture de la protéine de fusion produite en bactéries, le vecteur d'expression a été séquencé selon la méthode décrite dans la trousse " T7 sequencing kit" de la compagnie Pharmacia Biotech (Canada). L'amorce qui a été utilisée pour réaliser la séquence était le "5'pGEX sequencing primer" (5'd[GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG]-3') vendu commercialement chez Pharmacia Biotech (Canada).

## **1.3 Purification de la protéine de fusion GST-RRP1**

### **1.3.1 Détermination du meilleur clone pGEX 2TK recombinant**

Plusieurs colonies d'*E.coli* BL21 transformées avec le vecteur d'expression pGEX 2TK (contrôle) et le pGEX 2TK-RRP1 ont été prélevées puisensemencées dans des tubes contenant chacun 2 ml de milieu 2xYT-G (16g/L tryptone, 10g/L yeast extract, 5g/L NaCl, pH 7.0 et 20% glucose) supplémenté de 100µg/ml d'ampicilline. Ces cultures liquides ont alors été incubées à 37°C avec une agitation rapide pendant environ 3 à 5 heures de manière à

obtenir une densité optique oscillant entre 0.6 et 0.8 unités à 600 nm. L'expression des différentes protéines (GST et GST-RRP1) a été induite suivant l'ajout d'IPTG. Différentes concentrations (0.1mM, 0.3mM, 0.5mM, 0.7mM et 1mM) finales d'IPTG ont été utilisées afin de déterminer la concentration optimale requise pour chaque vecteur d'expression. L'incubation à 37°C s'est poursuivie pour une période additionnelle de 1 à 2 heures après quoi ces suspensions ont été transférées dans des tubes à microfuge de 1.5 ml pour être centrifugées 30 secondes à 13 000 rpm à l'aide d'une microfuge. Chaque culot ainsi obtenu a été resuspendu dans 300µl de PBS 1X froid (1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 137mM NaCl et 2.7mM KCl, pH 7.4) pour ensuite subir une lyse cellulaire par sonication ("High Intensity Ultrasonic Processor", Fisher Scientific, Canada) pendant environ 10 secondes. Il est à noter qu'à chaque étape 10µl d'échantillon a été conservé sur la glace afin d'être analysé à la fin sur gel SDS-PAGE. Ces lysats ont été centrifugés à 13 000 rpm durant 5 minutes à 4°C de façon à sédimenter le matériel insoluble et récupérer les surnageants. Par la suite, 20µl de glutathione-agarose 50% a été ajouté puis mélangé pour une période de 5 minutes à la température de la pièce, aux différents surnageants. Un volume de 100µl de PBS 1X a été ajouté aux tubes pour être ensuite "vortexés" brièvement et centrifugés durant 5 secondes de façon à sédimenter les billes d'agarose. Les surnageants ont été jetés et l'étape du lavage au PBS 1X a été répétée 2 autres fois avant de procéder à l'élution. Pour se faire, 10µl de tampon d'élution contenant 10mM de glutathione réduite et 50mM Tris-HCl pH 8.0 a été ajouté. Les billes d'agarose ont été correctement resuspendues puis incubées 5 minutes à la température de la pièce. Une étape de centrifugation a été réalisée pendant 5 minutes à 5 000 rpm pour ensuite récupérer les surnageants. Une analyse sur gel SDS-PAGE des différents aliquots appartenant aux diverses étapes menant à l'obtention des protéines GST et GST-RRP1 purifiées, a été effectuée afin de vérifier à la fois l'efficacité de production et de purification des protéines d'intérêt.

### 1.3.2 Analyse sur gel de polyacrylamide

L'analyse des protéines recombinantes purifiées a été réalisée selon la méthode décrite par Laemmli (1970). Un volume entre 10 et 20 $\mu$ l de suspension a été dilué avec 2 à 4 $\mu$ l de tampon d'échantillon 6X (0.35M Tris-HCl, pH 6.8, 10.28% (w/v) SDS, 36% (v/v) glycérol, 5%  $\beta$ -mercaptoéthanol, 0.012% (w/v) bromophénol bleu) contenant 6M urée et chauffée durant 5 minutes à 90-100°C. Les échantillons ont été déposés sur un gel de polyacrylamide 12%, lequel a été coloré, suivant sa migration à 150 volts, au Bleu de Coomassie (0.125% Bleu de Coomassie R-250, 50% méthanol et 10% acide acétique) pendant 10 minutes. Le gel a été décoloré dans une solution 10% acide acétique, 10% méthanol, nous permettant ainsi de visualiser la protéine de fusion et le GST contrôle à travers les différentes étapes successives de la purification.

### 1.3.3 Préparation de la colonne de glutathione sépharose 4B

Afin de déterminer le volume mort ("bed volume") de la colonne et donc d'évaluer la quantité idéale de matrice nécessaire à la purification optimale des diverses protéines, en l'occurrence le GST et le GST-RRP1, nous avons du tenir compte à la fois de la capacité maximale de fixation de la matrice (5mg de protéines/ml de matrice) et de la quantité totale de protéines produites après induction, dans l'extrait bactérien (Pharmacia Biotech, Canada). Pour se faire, différentes quantités du marqueur de poids moléculaires (Amersham, Canada) ont été déposées sur gel SDS-PAGE 12% au même titre que les extraits de cellules transformées avec les vecteurs d'expression pGEX 2TK et pGEX 2TK RRP1, ce qui a permis d'évaluer la concentration du GST à 2mg/ml, alors que celle du GST-RRP1 n'était qu'à 1mg/ml. Les "bed volume" du pGEX et du pGEX RRP1 ont donc été estimés respectivement à 1.6ml et à 2.5ml de glutathione sépharose. 2.1ml (pGEX) et 3.3ml (pGEX RRP1) de matrice ont donc été prélevés pour préparer les colonnes nécessaires à leur purification

compte tenu du fait que 1.33ml de glutathione sépharose correspondait à 1ml de "bed volume". Ces colonnes ont par la suite été lavées avec 10 "bed volume" de PBS 1X avant leur utilisation.

#### **1.3.4 Purification du GST et de la protéine du fusion GST-RRP1**

Deux flacons contenant chacun 25ml de milieu 2xYT-G supplémenté de 100µg/ml d'ampicilline ont été inoculés avec les différents transformants sélectionnés précédemment (section 1.3.1). Ces cultures liquides ont été incubées à 37°C avec une agitation vigoureuse durant une période de 12 à 15 heures après quoi elles ont été diluées dans 225ml de milieu 2xYT-G-ampicilline frais. L'incubation s'est poursuivie à 37°C jusqu'à l'obtention d'une densité optique s'échelonnant entre 1 et 2 unités à 600nm. La production des différentes protéines a été induite pendant 4 heures à 37°C avec agitation vigoureuse, suivant l'ajout d'IPTG. La concentration finale d'IPTG qui a été nécessaire à l'induction du vecteur d'expression pGEX était de 0.1mM, alors que 0.5mM IPTG a été requise pour le vecteur recombinant pGEX 2TK-RRP1. Ces concentrations ont été déterminées lors de la détermination des meilleurs clones producteurs de protéines GST et GST-RRP1 (section 1.3.1). Par la suite, ces cultures ont été centrifugées à 4°C pendant 15 minutes à 5 000g. Les culots ont été resuspendus dans 12.5ml de PBS 1X froid (50µl de PBS 1X/ml de culture initiale) contenant des inhibiteurs de protéases (1mM de PMSF, 1µg/ml leupeptine et 1µg/ml aprotinine). À cette étape, il était possible de congeler ces suspensions à -80°C jusqu'à leur utilisation. Par la suite, ces suspensions ont subi une lyse cellulaire, les différentes étapes étant d'abord de les traiter avec environ 0.1g/ml de lysosyme durant 15 minutes sur la glace. Elles ont ensuite été soniquées pendant une période de 3 minutes au total, à raison de 10 secondes de sonication suivi de 10 secondes de repos sur la glace. Puis, le lysat a subi 3 étapes de congélation/décongélation rapide dans la glace sèche. Ces suspensions ont ensuite été traitées pendant 20 minutes à 37°C avec 30U de DNase1 (Pharmacia Biotech, Canada) suivi par un traitement au Triton X-100 durant 30 minutes à une concentration finale de 1%.

Cette dernière incubation a nécessité une agitation constante par rotation à 4°C. Les lysats ainsi obtenus ont été transférés dans des tubes COREX de verre, et centrifugés à 12 000 rpm durant 20 minutes à 4°C. Les surnageants ont été récupérés puis transférés dans des tubes Falcon 15ml. Avant de charger ces surnageants sur leur colonne respective, celles-ci ont été équilibrées avec 200ml de PBS 1X froid (toutes les étapes subséquentes ont été réalisées à 4°C). Les surnageants ont été rechargés sur leur colonne à 5 reprises afin de s'assurer de l'efficacité de fixation des différentes protéines (GST et GST-RRP1). Par la suite, une étape de lavage, qui consistait à faire passer 150ml de PBS 1X contenant 1mM PMSF, 1µg/ml de leupeptine et 1µg/ml aprotine, a été réalisée. L'élution a été effectuée suivant l'ajout du tampon d'élution contenant 10mM de glutathione réduite ainsi que 50mM de Tris-HCl, pH 8.0 à raison de 1ml de tampon/ ml de matrice. Chaque ml de tampon qui a pénétré la matrice a été incubé durant 10 minutes à bouchon fermé pour ensuite être récupéré. Les volumes d'élution qui ont été utilisés afin de récupérer le GST ainsi que la protéine de fusion GST-RRP1, étaient respectivement 2ml et 3.3ml. Suivant l'obtention des différentes fractions de chaque purification, elles ont été analysées par immunobuvardage avec l'anti-GST (1:1000), un anticorps commercialement vendu par la compagnie Upstate Biotechnology Inc. (États-Unis), dans le but d'identifier les fractions contenant les diverses protéines recherchées (GST et GST-RRP1).

### **1.3.5 Régénération de la matrice**

La glutathione sépharose 4B (Pharmacia Biotech, Canada) a été régénérée après chaque utilisation au moyen d'un protocole établi par la compagnie Pharmacia Biotech (Canada). À prime abord, la matrice a été lavée en alternance avec 10ml de tampon Tris-HCl pH 8.5 (0.1 M Tris-HCl et 0.5M NaCl) et 10ml de tampon acétate pH 4.5 (0.1M sodium acétate et 0.5M NaCl). Cette étape a été répétée 3 fois après quoi, la colonne a été rééquilibrée avec 150ml de PBS 1X froid. Lorsqu'elle semblait perdre sa capacité de fixation causée par une trop grande accumulation de protéines précipitées, dénaturées ou associées de

manière non spécifique, la matrice a été lavée avec 2 "volume mort" de guanidine HCl 6M immédiatement suivi par un lavage avec 150ml de PBS 1X. L'entreposage de la colonne à 4°C a été effectué suivant l'ajout d'une solution d'éthanol 20% froide. Cette dernière a été rééquilibrée avec 150ml de PBS 1X avant d'être réutilisée. Toutes ces étapes ont été réalisées à 4°C.

## **1.4 Purification du partenaire protéique de ZPK**

### **1.4.1 Préparation des extraits cellulaires nécessaires à la purification d'un partenaire protéique de ZPK**

Les fibroblastes de souris NIH 3T3 ont été cultivés à 37°C dans des pétris de 150mm. À confluence, ces cellules ont été lysées dans une solution de PBS 1X contenant 5mM EDTA et des inhibiteurs de protéases (1mM PMSF, 1µg/ml leupeptine et 1µg/ml aprotinine) à raison de 5ml pour un nombre total de 7 pétris. Elles ont ensuite été homogénéisées à l'aide d'un homogénéisateur de type B (environ 20 coups) puis ultracentrifugées (rotor SW50.1) à 100 000g (30 000 rpm) pendant 1 heure dans une ultracentrifugeuse réfrigérée de la compagnie Beckman (Canada). Les culots ont été récupérés pour subir alors une solubilisation au Triton X-100 à une concentration finale de 1% pendant 1 heure à 4°C avec une agitation constante par rotation. Ces suspensions ont par la suite été ultracentrifugées également à 100 000g pendant 1 heure, après quoi les surnageants ont été récupérés puis transférés dans des tubes Falcon 15ml. Ils ont ensuite été dialysés pour une période de 6 heures à 4°C dans une solution de PBS 1X contenant 1mM PMSF, avant d'être chargés sur la colonne contenant une matrice de glutathione sépharose associée à la protéine de fusion GST-RRP1.

#### 1.4.2 Purification d'un partenaire potentiel capable d'interagir avec ZPK

Le protocole permettant de purifier un partenaire protéique potentiel de ZPK constitue en fait une variante du protocole de purification des protéines GST et GST-RRP1 déjà décrit précédemment à la section 1.3.4. Cette purification a également été réalisée au moyen d'une colonne à chromatographie d'affinité. Au lieu de procéder normalement à l'élution de la protéine de fusion, grâce à l'ajout du tampon d'élution contenant 10mM de glutathione réduite, une préparation de fractions membranaires (section 1.3.7) de cellules NIH 3T3 a été chargée sur la colonne, pour être ensuite repassée 9 autres fois avant d'effectuer une étape de lavage avec 150ml de PBS 1X froid contenant 1mM PMSF, 1µg/ml leupeptine et 1µg/ml aprotinine. Afin de récupérer les protéines issues des fractions membranaires ayant interagi spécifiquement avec la protéine de fusion GST-RRP1, un gradient d'élution caractérisé par diverses concentrations de NaCl (0.2M, 0.5M, 0.8M et 1.0M) a été chargé sur la colonne à raison de 3ml par concentration. Des fractions de 500µl ont été récupérées et analysées à la fois sur gel de polyacrylamide et par immunobuvardage à l'aide de l'anti-GST. L'utilisation de la membrane a permis de réaliser la technique du Far Western décrite à la section suivante. Les fractions des premières purifications ont été précipitées au méthanol 100% durant toute une nuit pour ensuite être centrifugées 30 minutes à 13 000 rpm dans une microfuge à 4°C. Les culots ont été resuspendus dans du tampon d'échantillon 1X (1% SDS, 50mM DTT, 30mM Tris-HCl, pH 6.8, 5% glycérol, 0.005% bromophénol bleu). Ces échantillons ont permis, suivant leur migration sur gel SDS-PAGE suivi de leur transfert sur membrane de PVDF, d'identifier les fractions comportant les protéines ayant été capables d'interagir avec ZPK. Suite à cette identification, les fractions cibles des purifications qui ont suivi (2 purifications donc 14 puits de 150µl), ont directement été lyophilisées après les avoir dialysées toute une nuit à 4°C dans un tampon de carbonate d'ammonium pH 7.4 de 5mM contenant 1mM PMSF. La poudre ainsi obtenue après 4 heures et demi de lyophilisation a été resuspendue dans 80µl de tampon d'échantillon 1X. Un volume de 40µl de cette préparation a été déposée sur un gel de polyacrylamide 12% en vue d'être coloré au Bleu de Coomassie,

alors que le 40µl restant a également été déposé sur le gel SDS-PAGE, à raison de 20µl par puit, dans le but d'être transféré sur membrane et ainsi procéder à un Far Western (section suivante). Cette stratégie était nécessaire à l'identification de la protéine capable d'interagir spécifiquement avec la région proline riche de ZPK. À cette fin, les patrons de bandes obtenus par autoradiographie suite à l'hybridation de la membrane avec les protéines GST et le GST-RRP1, ont été comparés de manière à l'identifier. La bande correspondante colorée au Bleu de Coomassie a été découpée finement et analysée par spectre de masse.

### 1.4.3 Far Western

Cette technique a permis l'identification d'un partenaire potentiel de ZPK. Pour réaliser cette expérience, des quantités égales de protéines issues de la purification par chromatographie d'affinité ont été déposées sur gel SDS-PAGE 12%, lequel suivant sa migration, a été transféré sur membrane de PVDF. Cette membrane a été bloquée toute une nuit à 4°C dans une solution de TBS contenant 5% de lait en poudre. Avant de procéder aux réactions d'anticorps, la membrane a subi une seconde incubation dans la solution de TBS contenant cette fois-ci, 0.25% Tween-20 ainsi que 5µg de chaque protéine purifiée, en l'occurrence le GST et le GST-RRP1, pour une période additionnelle de 12 à 15 heures. Cette membrane devait donc contenir chaque échantillon en double de façon à leur permettre d'être incubé à la fois avec le GST (contrôle) et le GST-RRP1. Une période d'incubation de 20 minutes avec agitation à la température de la pièce a précédé l'initiation de la réaction avec l'anti-GST (1:1 000, Upstate Biotechnology Inc., États-Unis).



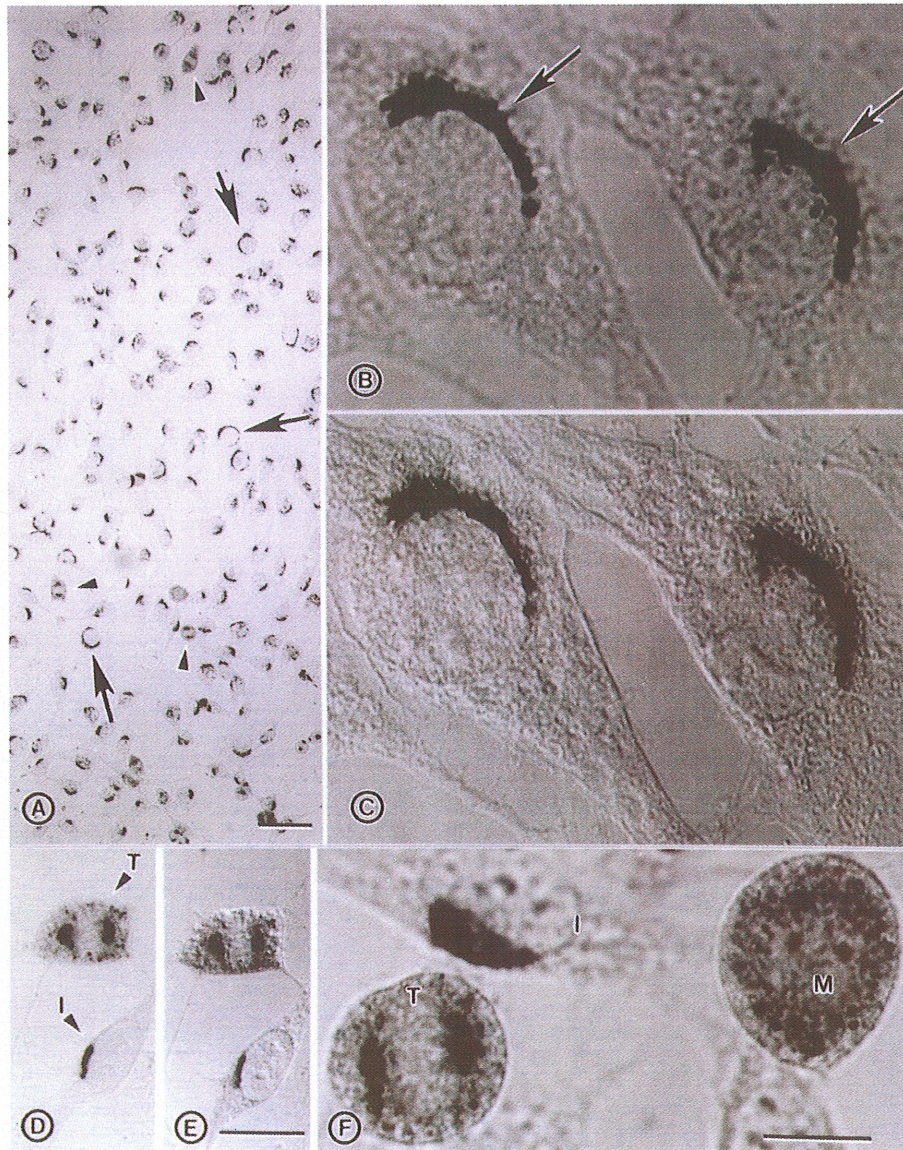
## CHAPITRE 2

### RÉSULTATS

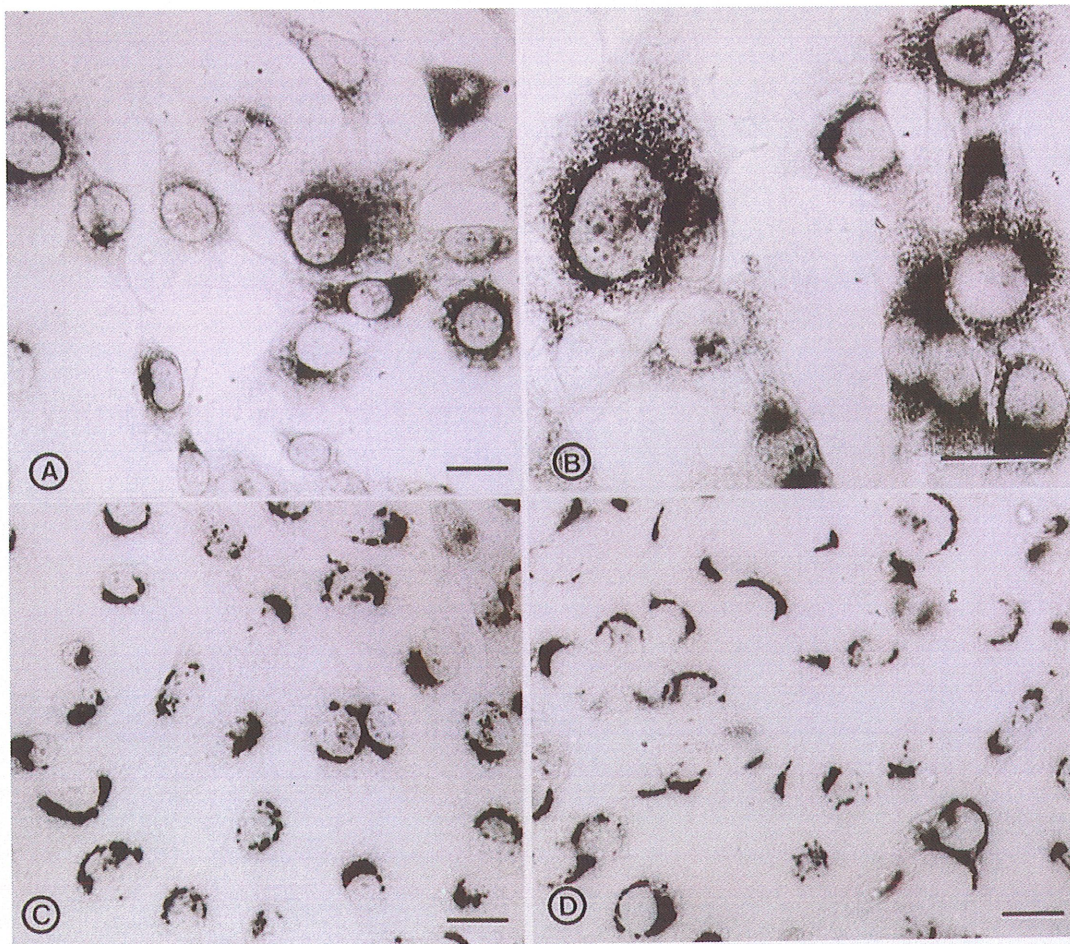
#### 2.1 Localisation subcellulaire de ZPK dans les cellules NIH 3T3

La localisation subcellulaire de ZPK a initialement été examinée dans les cellules NIH 3T3 par immunohistochimie au moyen d'un anticorps primaire, l'anti-ZPK, et d'un second anticorps conjugué à la phosphatase alcaline. La Figure 17 permet de visualiser les résultats obtenus. En effet, les cellules en interphase démontrent toutes une réactivité au niveau d'une structure juxtanucléaire caractéristique de l'appareil de Golgi (Figure 17, A-F), contrairement aux cellules incubées avec le sérum pré-immun (résultat non présenté). Or, la distribution périnucléaire de ZPK est perturbée au sein des cellules mitotiques ce qui est consistant avec l'idée d'une localisation au Golgi. Durant la métaphase, alors que les cellules adoptent une forme arrondie, ZPK est localisé dans des structures similaires à des vésicules uniformément distribuées à travers le cytoplasme alors qu'en télophase précoce, un signal intense est visualisable dans la région centrosomale des fuseaux mitotiques (Figure 17, A et D-F).

Afin de fournir des évidences additionnelles quant à la localisation de ZPK au niveau de l'appareil de Golgi, d'autres expérimentations d'immunohistochimie toujours avec l'anti-ZPK en tant qu'anticorps primaire, ont été réalisées à l'aide de cellules NIH 3T3 ayant été exposées ou non à la Bréfeldine A (BFA). La BFA est une toxine fongique capable d'induire à la fois la ségrégation des saccules du Golgi dans le réticulum endoplasmique ainsi que le collapsus du "trans Golgi network" au niveau du centre organisateur des microtubules (MTOC) (Pelham, 1991). À la Figure 18, A et B, les cellules NIH 3T3 ont été traitées pendant 1 heure avec la BFA. Comme il est possible de le constater, ce traitement occasionne la dispersion quasi-



**Figure 17. Localisation immunocytochimique de ZPK endogène dans les cellules NIH 3T3.** Les cellules ont été fixées dans une solution méthanol/acétone. L'immunohistochimie a été réalisée en présence de l'anti-ZPK suivi par un anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline. A. La localisation du signal est principalement dans la région du Golgi. Les flèches ainsi que les têtes de flèches pointent respectivement les cellules en interphase et en mitose. B. À fort grossissement, le signal est préférentiellement localisé dans une structure juxtanucléaire caractéristique de l'appareil de Golgi. C. Même chose qu'en B mis à part le fait que les cellules ont été observées en contraste interférencielle de Nomarski. D. ZPK démontre une distribution différentielle dans les cellules en interphase (I) et en télophase (T). E. Même chose qu'en D mis à part le fait que les cellules ont été observées en contraste interférencielle de Nomarski. F. À fort grossissement, les cellules montrent une localisation différentielle du signal dans les cellules en interphase (I), en métaphase (M), et en télophase (T). Barres: (A) 50  $\mu\text{m}$ ; (B,C, et F) 10 $\mu\text{m}$ ; (D et E) 20 $\mu\text{m}$ .



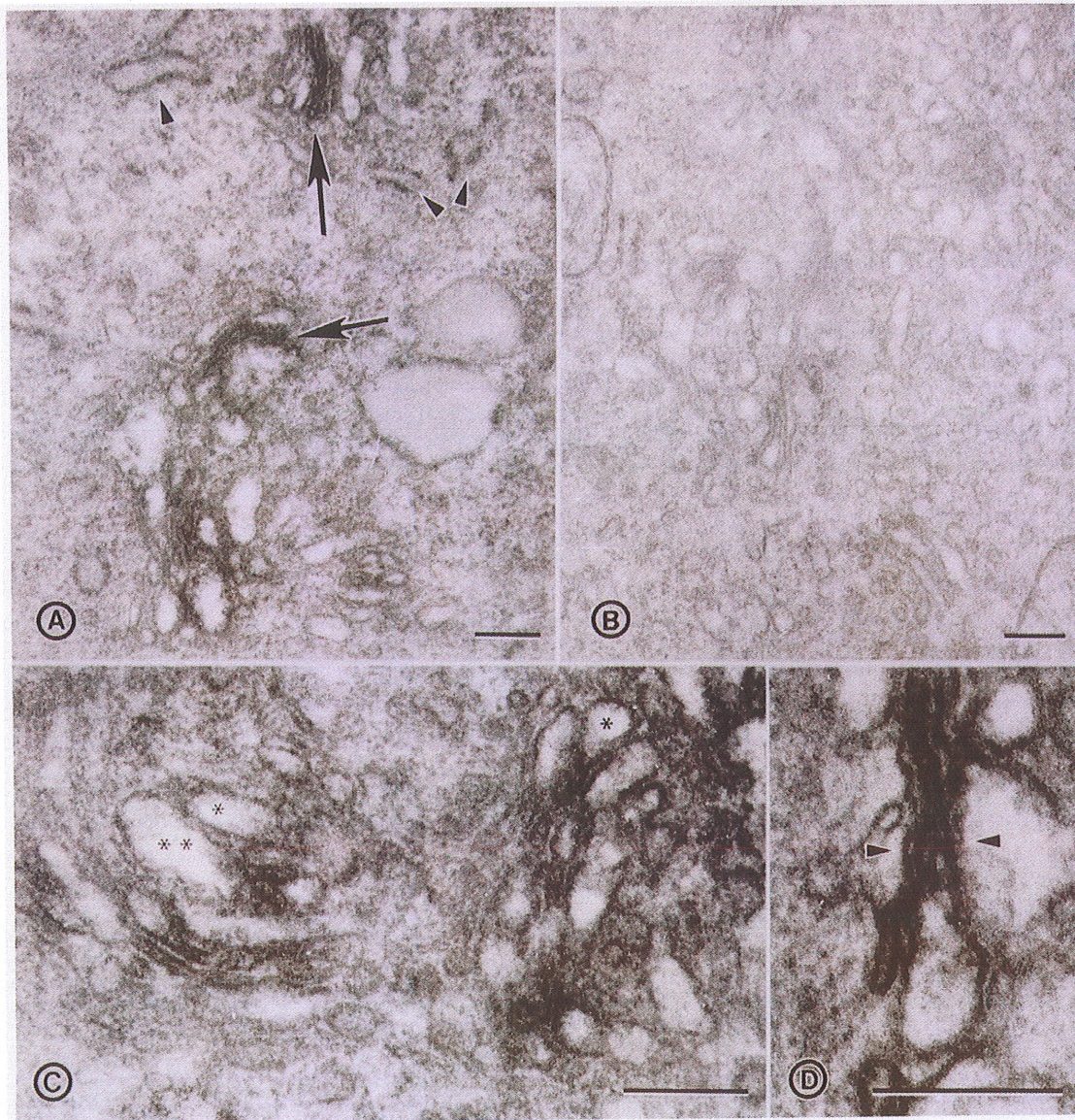
**Figure 18. Effet de la Bréfeldine A (BFA) sur la distribution de ZPK endogène.** A. et B. Les cellules NIH 3T3 ont été traitées pendant 1 heure avec  $2\mu\text{g/ml}$  de BFA de façon à briser l'appareil de Golgi, pour ensuite être fixées dans une solution méthanol/acétone. L'immunohistochimie a été réalisée grâce à l'utilisation d'un anticorps anti-ZPK. Le traitement à la BFA perturbe la distribution juxtanucléaire de ZPK. C. Les cellules NIH 3T3 ont été incubées pendant 1 heure en présence de  $2\mu\text{g/ml}$  de BFA après quoi les cellules ont été rincées et réincubées durant 1 heure en absence de BFA avant d'être fixées. L'effet perturbateur de la BFA sur la distribution de ZPK est réversible suivant le retrait de la drogue dans le milieu de culture. D. Cellules NIH 3T3 contrôles ayant été cultivées en présence d'éthanol, le solvant de la BFA, avant d'être fixées pour réaliser l'immunohistochimie avec l'anti-ZPK. Barre,  $20\mu\text{m}$

complète de ZPK dans le cytoplasme. Cette effet perturbateur sur la localisation subcellulaire de ZPK est toutefois renversé lorsque la drogue est enlevée du milieu de culture. Dès lors, il est possible de retrouver la distribution normale de ZPK dans la région périnucléaire de ces cellules fibroblastiques (Figure 18 C). Ces dernières ont également été traitées à l'éthanol en tant que contrôle, compte tenu du fait que la BFA devait être dissoute dans l'éthanol. Ce traitement n'a eu aucun effet sur la distribution juxtanucléaire de ZPK (Figure 18 D).

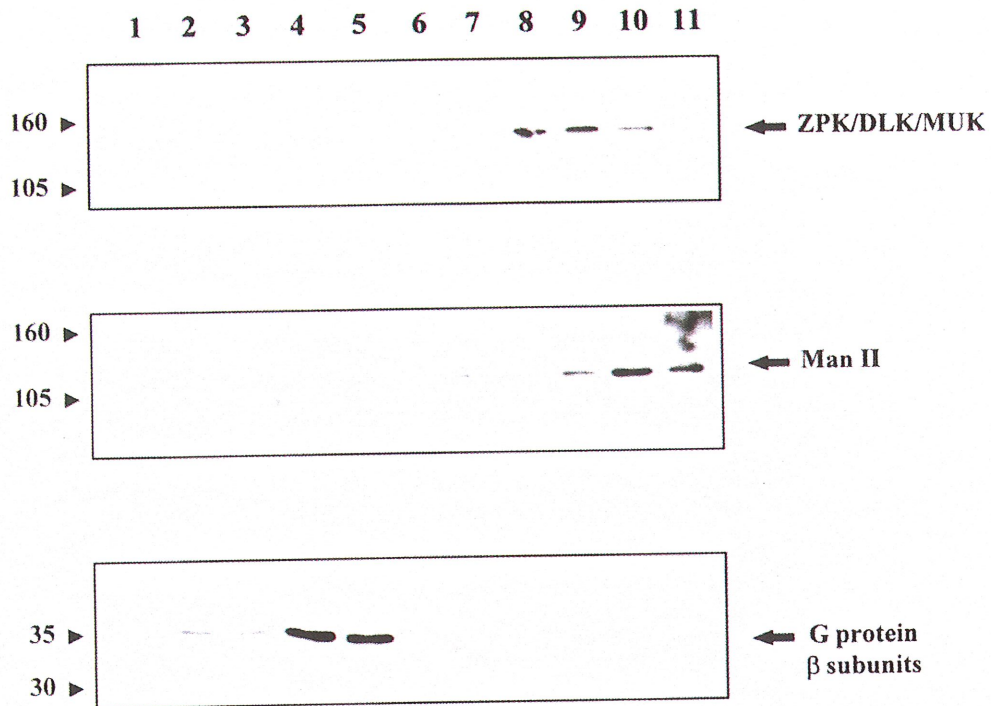
La microscopie immunoélectronique a également permis l'observation de la localisation subcellulaire de ZPK dans les cellules NIH 3T3 (Figure 19). Comme nous l'ont laissé croire les analyses d'immunohistochimie, la protéine ZPK est effectivement localisée dans la région de l'appareil de Golgi où elle semble associée aux membranes (Figure 19, A et B). De plus, aucun marquage n'est observé dans la lumière des vésicules du Golgi (Figure 19 D).

## **2.2 Copurification de ZPK avec l'appareil de Golgi par fractionnement subcellulaire**

Afin de confirmer d'un point de vue biochimique l'association de ZPK au Golgi, les cellules NIH 3T3 ont été fractionnées sur un gradient de Percoll selon une méthode permettant de séparer efficacement les membranes plasmiques, l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique et les lysosomes (Morand et Kent, 1986). Chaque fraction recueillie a ensuite été étudiée par immunobuvardage avec l'anti-ZPK ainsi que l'anti- $\alpha$ -mannosidase II (Man II) et l'anti-sous-unité  $\beta$  des protéines G, deux marqueurs protéiques représentatifs de l'appareil de Golgi et des membranes plasmiques respectivement. Des analyses par immunobuvardage (Figure 20 A et B) révèlent l'existence d'un chevauchement au niveau du profil de fractionnement entre ZPK et la Man II, le marqueur spécifique du Golgi. Ces protéines sont toutes deux particulièrement enrichies dans certaines fractions, et ce chez



**Figure 19. Analyse par microscopie électronique de la localisation subcellulaire de ZPK dans les NIH 3T3.** A. La localisation par immunopéroxydase démontre la présence du produit de la réaction au niveau de l'appareil de Golgi (flèche). Aucune réaction n'est visible dans le réticulum endoplasmique (tête de flèche). B. Cellules contrôles incubées avec le sérum pré-immun. C. La visualisation à fort grossissement des cellules NIH 3T3 montre l'absence de marquage dans la lumière des vésicules localisées dans le région du Golgi (astérisque). D. À fort grossissement, les cellules marquées avec l'anti-ZPK montrent l'association du produit de la réaction de la peroxydase avec les membranes de l'appareil de Golgi (tête de flèche). Barre, 0.25 $\mu$ m.

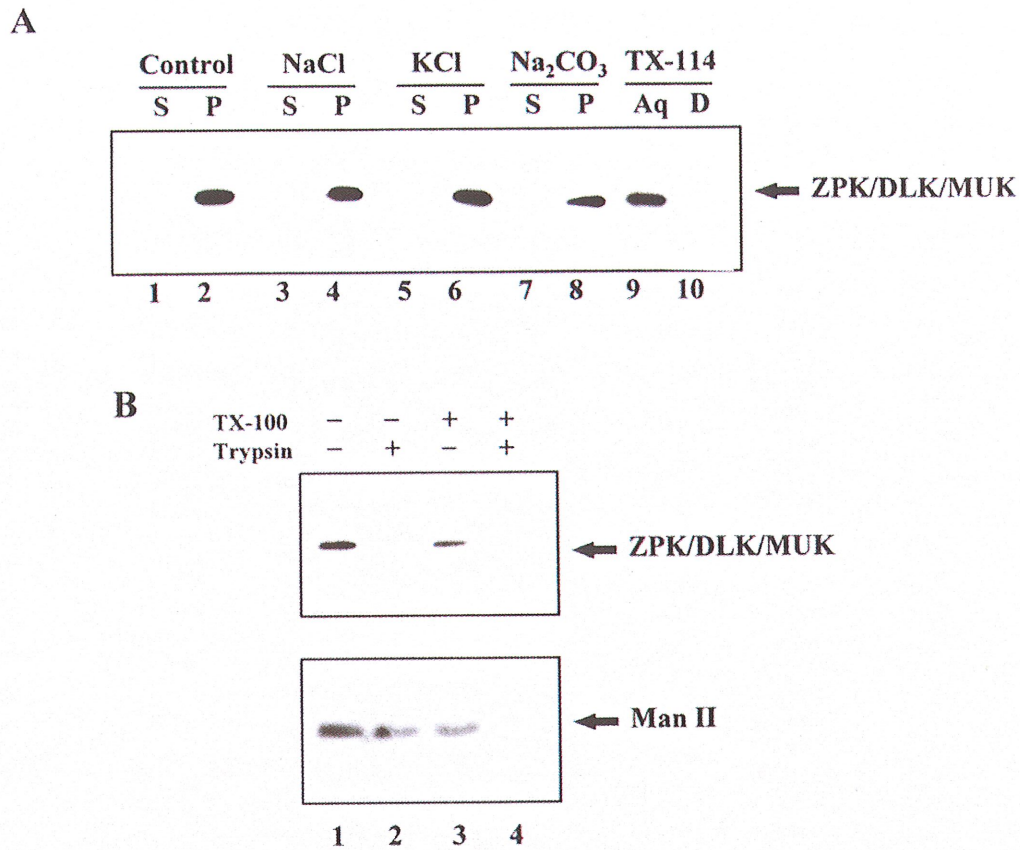


**Figure 20. Distribution subcellulaire de ZPK.** A. Les cellules NIH 3T3 homogénéisées ont été fractionnées par ultracentrifugation sur gradient de Percoll tel que décrit dans la section 1.1.3 du chapitre 1. Des quantités égales de protéines (200 $\mu$ g) ont été déposées sur gel SDS-PAGE, lequel a été transféré sur membrane de PVDF dans le but de réaliser une analyse d'immunobuvardage à l'aide de l'anti-ZPK, l'anti-ManII et l'anti-sous-unité  $\beta$  des protéines G.

tous les gradients de Percoll qui ont été vérifiés. Une proportion considérable de ces protéines a copurifié dans les fractions 9 et 10. Un enrichissement mutuellement exclusif de ZPK et de la Man II est également observé de façon respective dans les fractions 8 et 11, cependant la signification de cette observation n'a pas encore été éclaircie. La présence des membranes plasmiques au sein des différentes fractions du gradient est démontrée par la distribution de la sous-unité  $\beta$  des protéines G. Cette dernière est principalement détectée dans les fractions numéros 2, 3 et 4, contrairement au signal de ZPK qui n'est pas observé dans ces fractions (Figure 20 C).

### **2.3 Association de ZPK aux membranes du Golgi et disposition topologique**

La nature de l'association de ZPK aux membranes du Golgi a été définie grâce à l'utilisation de différentes procédures d'extraction suivie d'une analyse par immunobuvardage. À la Figure 21 A, l'immunoréactivité de ZPK est uniquement détectée dans la fraction membranaire préparée à partir de cellules NIH 3T3 (lignes 1 et 2) et non dans la fraction cytosolique. La fraction particulaire a ensuite subi divers traitements dans un tampon contenant soit 1M NaCl, 1M KCl ou 0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 11.5 (lignes 3 à 8). Cette analyse a démontré qu'aucun des traitements utilisé ne peut perturber l'association de ZPK aux membranes du Golgi puisque son immunoréactivité demeure dans la fraction particulaire. Toutefois, lorsqu'une préparation membranaire est sujette à une extraction au Triton X-114, un détergent permettant de discriminer entre les protéines hydrophiliques et amphiphiliques, ZPK est entièrement relocalisé dans la phase aqueuse (lignes 9 et 10). Ces résultats indiquent que ZPK est une protéine périphérique fortement associée aux membranes de l'appareil de Golgi. Cette conclusion supporte nos résultats de microscopie sur la localisation de ZPK.



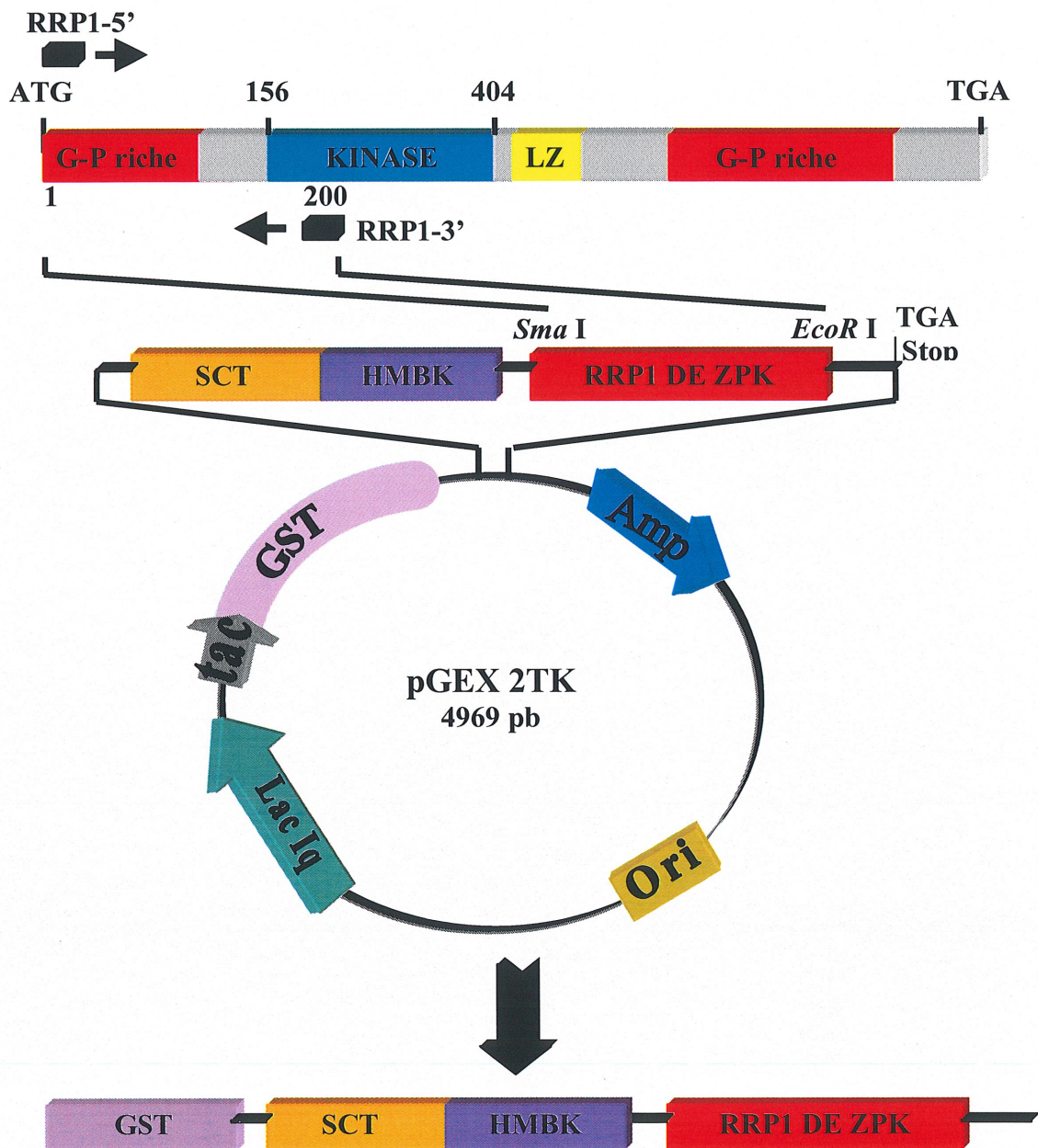
**Figure 21. Association de ZPK aux membranes du Golgi et disposition topologique.** A. Les fractions particulières de cellules NIH 3T3 ont été traitées avec un tampon contrôle (lignes 1 et 2), 1M NaCl (lignes 3 et 4), 1M KCl (lignes 5 et 6), et 0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11.5 (lignes 7 et 8) pendant 30 minutes à 4°C pour ensuite être centrifugées dans le but de récupérer les surnageants (S) et les culots (P). Chaque fraction a alors été sujet à une analyse par immunobuvardage à l'aide de l'anti-ZPK, suivant leur migration sur gel SDS-PAGE. L'une des fractions membranaires de cellules NIH 3T3 a également subi un traitement au Trion X-114 pour ensuite récupérer la phase aqueuse (Aq, ligne 9) et la phase détergent (D, ligne 10). B. Les fractions particulières de cellules NIH 3T3 ont été incubées sans (lignes 1 et 3) ou avec 0.1µg/ml de trypsine (lignes 2 et 4) en absence (lignes 1 et 2) ou en présence de 1% Triton X-100 (lignes 3 et 4) pendant 20 minutes à 4°C. Chaque échantillon a alors été immunoprécipité soit avec l'anti-ZPK soit avec l'anti-ManII. Les immunocomplexes ont finalement été déposés sur gel SDS-PAGE et analysés par immunobuvardage en utilisant l'anticorps dirigé contre ZPK (en haut) ou contre la ManII (en bas).



La disposition topologique de ZPK a ensuite été déterminée au moyen de fractions particulières préparées à partir de cellules NIH 3T3 ayant été exposées à une digestion avec de la trypsine en présence ou en absence de détergent. La Figure 21 B montre que la protéine kinase ZPK est complètement digérée lorsqu'elle est exposée à la trypsine même en absence de détergent (en haut). Sous ces mêmes conditions par contre, la Man II, une protéine membranaire faisant face à la lumière du Golgi, est résistante à la digestion (Figure 21 B, en bas). L'immunoréactivité de la Man II est cependant perdue lorsque la digestion est réalisée en présence de détergent, permettant ainsi d'exposer la protéine à la trypsine (Figure 21 B, en bas). Tous ces résultats suggèrent que ZPK est une protéine périphérique ancrée sur la face externe de l'appareil de Golgi.

#### 2.4 Construction du vecteur d'expression pGEX 2TK recombinant

Considérant que ZPK ne possède aucun domaine transmembranaire ni séquence signal, nous avons tenté d'identifier et de caractériser un partenaire protéique potentiel de ZPK susceptible d'assurer son association et sa localisation au niveau de l'appareil de Golgi. À cette fin, nous avons dans un premier temps amplifié par PCR sa région proline riche localisée du côté amino-terminal (acides aminés 1 à 200) à l'aide d'oligonucléotides spécifiques (RRP1-5' et RRP1-3') dont les séquences sont indiquées dans la section 1.2.1 du chapitre 1 (Figure 22). Cette région contient un motif PXXP qui s'apparente à ceux reconnus par des protéines possédant un domaine SH3. Ces amorces oligonucléotidiques permettaient de générer de part et d'autre du domaine amplifié deux sites de restriction. Ces sites, correspondant respectivement à *SmaI* et à *EcoRI*, étaient nécessaires à son clonage dans le vecteur d'expression pGEX 2TK également digéré à l'aide des mêmes enzymes de restriction. 600 paires de bases, dont la séquence est représentée à la Figure 23, ont donc été amplifiées, digérées puis clonées *SmaI-EcoRI*. La Figure 23 permet également de visualiser les séquences



**Figure 22. Construction du vecteur d'expression recombinant pGEX 2TK RRP1.** La région riche en prolines de ZPK (600 pb) a été amplifiée par PCR à l'aide d'amorces, soit RRP1-5' et RRP1-3', puis clonée dans le site *Sma*I- *Eco*RI dans le vecteur d'expression pGEX 2TK (4969 pb). Ce vecteur comporte au sein de sa séquence deux régions, l'une d'elle est reconnue par la Thrombine (SCT) l'autre par la "Heart Muscle Bovin Kinase" (HMBK). Il contient une origine de répllication bactérienne du plasmide pBR322, et une séquence codant la glutathione S-transférase, laquelle est sous le contrôle du promoteur *tac* qui est inductible à l'IPTG. (SC: site de clivage)

**RRP1-5'** tcccc catggcctgcctccatga **3'** **5'**  
 3' ————— gtaccggacggagtact ————— 5'

1 gacagcagggcccgtgctcagcacacctggtccagagccatggcctgcctccatgaaacccgaacacctccct  
M A C L H E T R T P S P

78 tcctttggggccttgctctactctaagtgaggctctatgcgaaacgtgatccagacacttcagactgcacccccgag  
S F G G F A S T L S E A S M R N V D P D T S D C T P E

159 aaagacctgacgccaccaccaatgtgtacttcgagatgttgctctcggtgggcagggtggaggaggaccagcccc  
K D L T P T Q C V L R D V V P L G G Q G G G G P S P

236 tccccaggtggagagcctccccagagccttttgccaatagtgtcctccagctacatgagcaggatacaggtgggcca  
S P G G E P P P E P F A N S V L Q L H E Q D T G G P

315 gggggagccactgggtcacctgagagtcgagcatctagagttcgagctgatgaggtacgtctgcagtgccagagt  
G G A T G S P E S R A S R V R A D E V R L Q C Q S

390 ggcagtggttccttgaaggtcttttgctgcctgcgcctgtctggacaatgattggcaaagcctactccacagaacac  
G S G F L E G L F G C L R P V W T M I G K A Y S T E H

471 aagcaacagcaggaagacctttgggaagtcccctttgaggaaatcctggacctgcagtggttaggctcaggggct  
K Q Q Q E D L W E V P F E E I L D L Q W V G S G A

546 cagggctgctgttttctgggacgctccacggggaggaggtagctgtgaagaaggttcgagatctcaaggagact  
Q G A V F L G R F H G E E V A V K K V R D L K E T

tagttcgtagaagctttc ccttaagg **RRP1-3'**

621 gacatcaagcatcttcgaaagctgaagcaccacaatcatcactttcaagggtgtttgcacacaggccccctgctactgc  
D I K H L R K L K H P N I I T F K G V C T Q A P C Y C

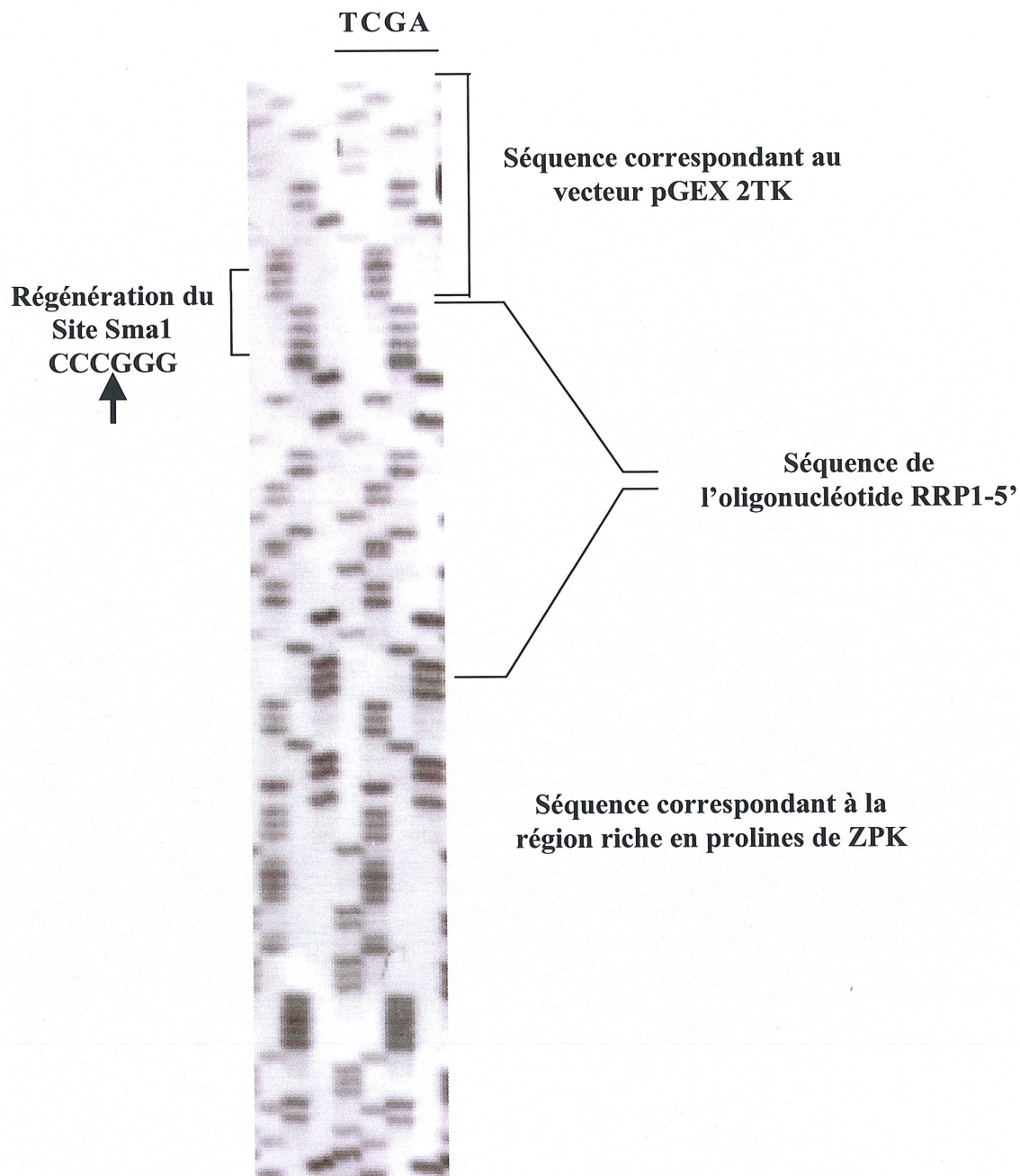
//.

**Figure 23. Séquence correspondant à la région riche en prolines de la protéine ZPK ayant été amplifiée par PCR au moyen d'oligonucléotides spécifiques.** Les régions soulignées, soit l'une du côté amino-terminal du domaine, l'autre du côté carboxy-terminal, correspondent aux séquences complémentaires des oligos (RRP1-5' et RRP1-3') utilisés pour l'amplification. Cette région amplifiée est constituée de 200 acides aminés dont le premier correspond à la méthionine (ATG) du codon d'initiation. Le domaine proline riche, dont la séquence consensus est PXXP, est indiqué en caractères gras et souligné d'un trait non continu.

complémentaires reconnues par les oligos, les bases d'intérêts étant marquées d'un trait continu.

## 2.5 Purification du GST et de la protéine de fusion GST-RRP1

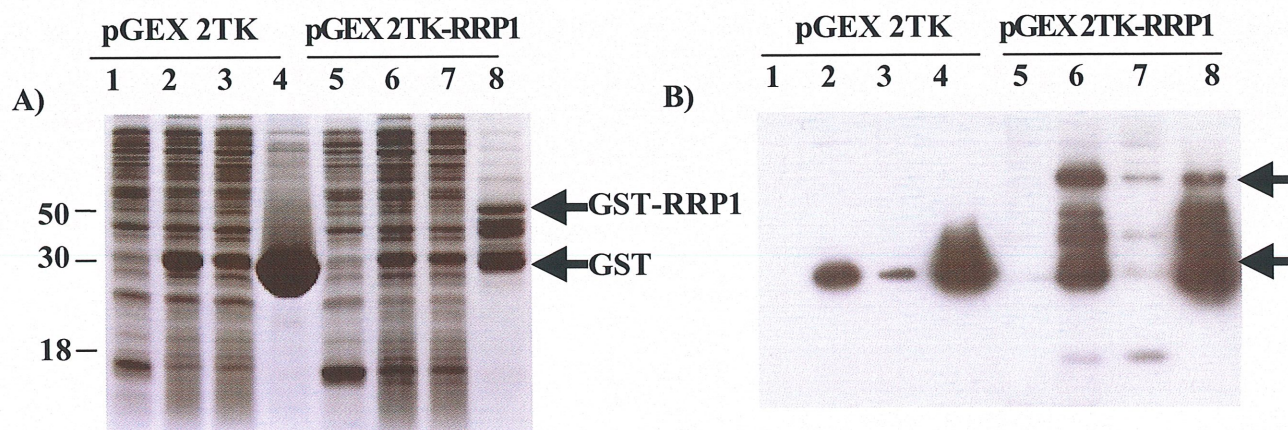
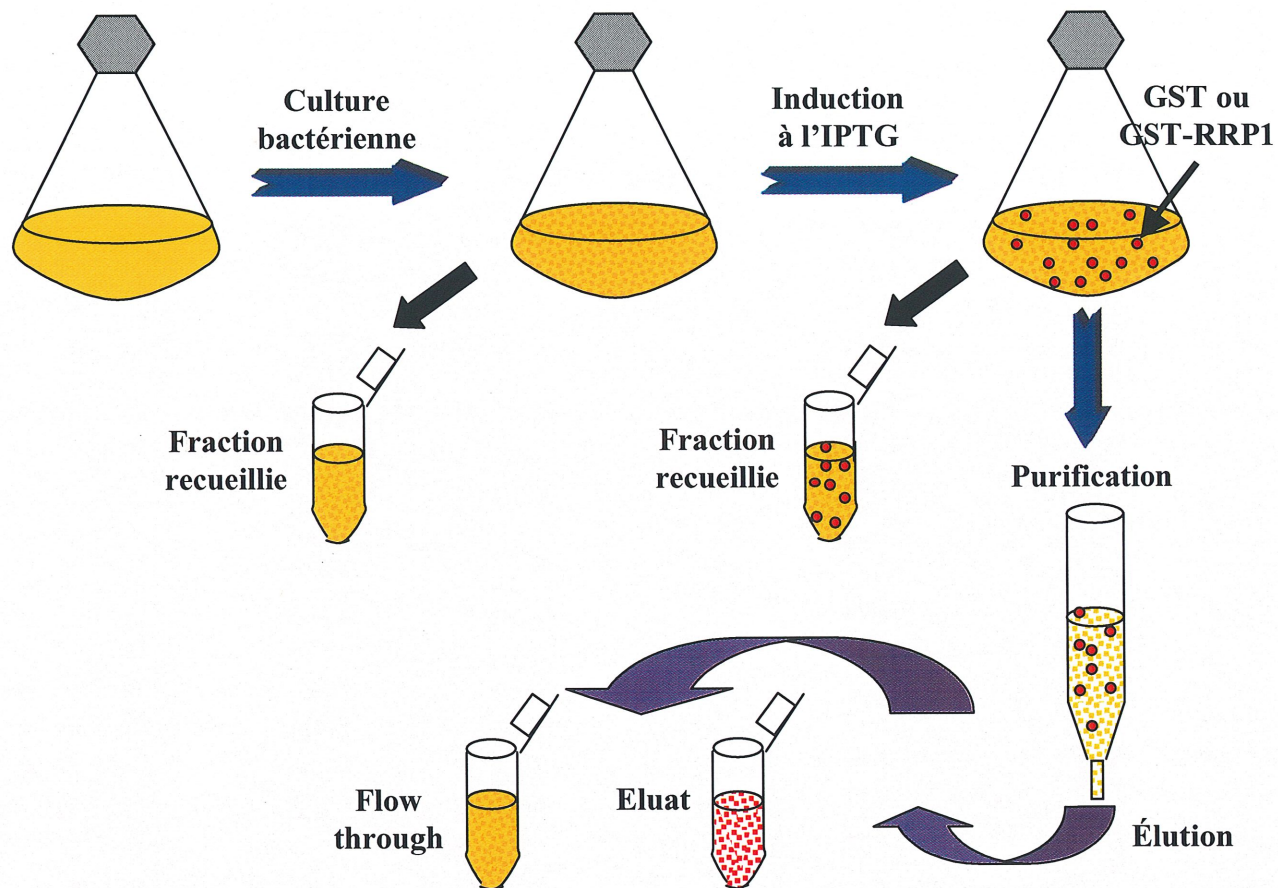
Après avoir vérifié par séquençage la validité du cadre de lecture de cette nouvelle construction (Figure 24), divers tests d'induction à l'IPTG ont été réalisés dans le but de cribler et ainsi déterminer le meilleur clone producteur de protéines de fusion. Cette identification a ensuite menée à une production à grande échelle tant du GST-RRP1 que du GST. La Figure 25 A représente quelques étapes de la purification des diverses protéines, en l'occurrence le GST (lignes 1 à 4) et le GST-RRP1 (lignes 5 à 8), lesquelles étant respectivement caractérisés par un poids moléculaire d'environ 26 kDa et 44 kDa (GST: 26 kDa + GST-RRP1: 18 kDa). 20 µg de protéines issus des différents aliquots recueillis à chaque étape de la purification ont été déposés sur gels SDS-PAGE et l'un de ces gels a été soumis à une analyse d'immunobuvardage avec un anticorps anti-GST. Dans les deux cas, les pistes 1 et 5 correspondent à une fraction de la suspension bactérienne non induite à l'IPTG, alors que dans les pistes 2 et 6 il est possible de visualiser l'induction de la synthèse des protéines. Les pistes 3 et 7 correspondent aux protéines ("Flow through") n'ayant aucune affinité pour la glutathione sépharose. Les pistes 4 et 8 constituent respectivement les protéines GST et GST-RRP1 purifiées. Cette dernière (piste 8), présente un patron de bandes caractérisé par différents poids moléculaires oscillant entre environ 30 kDa et 50 kDa. Certaines analyses d'immunobuvardage réalisées à l'aide de l'anti-GST (Figure 25 B) et de l'anti-ZPK (résultat non présenté) ont effectivement démontré que ces diverses bandes correspondaient à différents produits de traduction de la protéine de fusion GST-RRP1. Puisque



TCT GTT GGA TCC CCG GGG GAC ATG GCC TGC CTC CAT GAA ACC  
 CGA ACA CCC TCC CCT TCC TTT GGG GGC TTT GCG TCT ACT //

**Figure 24. Gel de séquence du vecteur d'expression recombinant pGEX 2TK-RRP1.**

La séquence en bleu correspond à celle du vecteur pGEX 2TK, alors qu'en rouge, il s'agit de la séquence codant la région riche en prolines amplifiée par PCR. La région soulignée constitue une partie de la séquence de l'oligonucléotide RRP1-5'.

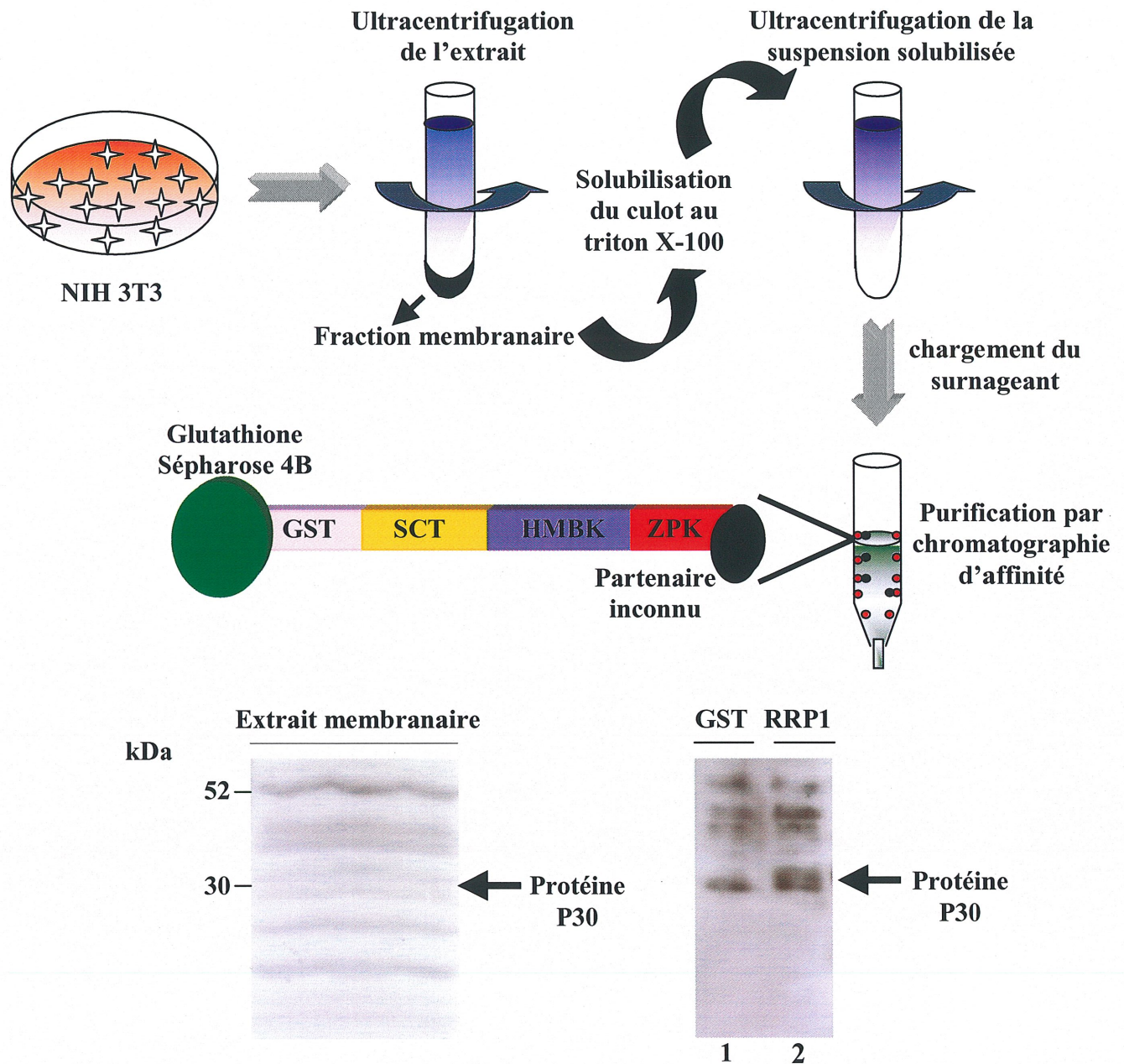


**Figure 25. Étapes de la purification du GST et de la protéine de fusion GST-RRP1.** Chaque aliquot appartenant aux différentes étapes de la purification par chromatographie d'affinité, a été recueilli pour être analysé à la fois par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (a) et par immunobuvardage (b). Les pistes 1 (GST) et 5 (GST-RRP1) correspondent à une fraction de chaque suspension bactérienne n'ayant pas encore été induite à l'IPTG, contrairement aux pistes 2 (GST) et 6 (GST-RRP1). Les pistes 3 et 7 représentent les protéines du "flow through", alors que les pistes 4 (GST) et 8 (GST-RRP1) constituent les protéines purifiées.

le GST est fusionné du côté amino-terminal, il est normal que ces nombreuses protéines soient reconnues sur une colonne chromatographique de glutathione sépharose, lors de la purification.

## 2.6 Purification d'un partenaire protéique de ZPK par chromatographie d'affinité

Pour être en mesure de purifier par chromatographie d'affinité un ou des partenaire(s) protéique(s) susceptible(s) d'interagir avec la région riche en prolines de ZPK, tout en tenant compte du fait qu'elle a été localisée au Golgi, nous avons dans un premier temps préparé des extraits membranaires de cellules NIH 3T3. Pour se faire, les cellules ont d'abord été ultracentrifugées de façon à récupérer les membranes, lesquelles ont ensuite été solubilisées pendant 1 heure à l'aide de Triton X-100. La suspension ainsi obtenue a par la suite été ultracentrifugée à nouveau. Le surnageant contenant les innombrables protéines associées normalement aux membranes, a été récupéré pour ensuite être dialysé et déposé sur une colonne chromatographique contenant une matrice de glutathione sépharose associée par affinité à la protéine de fusion GST-RRP1. Cette association a permis aux protéines membranaires de l'extrait d'interagir s'il y avait lieu avec la région proline riche de ZPK. Après avoir lavé convenablement la colonne, nous avons procédé à l'élution des complexes protéiques au moyen d'un gradient de sel. Les fractions recueillies ont été dialysées puis lyophilisées avant d'être resuspendues dans 80 µl de tampon d'échantillon. Cette préparation a ensuite été déposée sur un gel SDS-PAGE, lequel a été coloré au bleu de Coomassie afin de visualiser les différentes protéines ayant interagi avec le GST-RRP1 (Figure 26 A). Toutefois, pour éviter de confondre et ainsi identifier une protéine émanant d'une interaction non spécifique avec le GST, nous avons également procédé à un Far Western avec cette même préparation (Figure 26 B). La comparaison du patron de bandes obtenu entre le GST (ligne 1) et le GST-RRP1 (ligne 2) a permis d'identifier une protéine d'environ 30 kDa (P30) (pointée par une flèche) capable d'interagir spécifiquement avec la région proline riche de ZPK. Par superposition, cette même protéine a été identifiée (pointée à l'aide d'une flèche)



**Figure 26. Identification d'un partenaire protéique capable d'interagir avec la région riche en prolines de ZPK.** Purification par chromatographie d'affinité d'une protéine d'environ 30 kDa (P30) issue d'une préparation membranaire de cellules NIH 3T3, capable d'interagir avec la région proline riche de ZPK associée à la matrice de glutathione sépharose 4B. Suivant l'élution, les fractions sont recueillies, dialysées et lyophilisées avant d'être déposées sur un gel SDS-PAGE, lequel aura une portion coloré au Bleu de Coomassie, l'autre transférée sur PVDF afin de réaliser un Far Western avec le GST (ligne 1) et le GST-RRP1 (ligne 2). La protéine de 30 kDa est pointée par une flèche (P30).



parmi les différentes protéines visualisables au bleu de Coomassie pour ensuite être découpée finement et ainsi procéder à la détermination de son spectre de masse. Les résultats de cette analyse réalisée au Centre Hospitalier de l'Université Laval par "Le service de séquence de peptides de l'est du Québec" ont montré que la protéine P30 possède un patron de digestion ne correspondant à aucune protéine connue (Figure 27). Par conséquent, il faudra procéder à l'analyse de sa séquence par dégradation d'Edman avant de poursuivre l'étude sur la nature de l'interaction existant entre ZPK et P30.

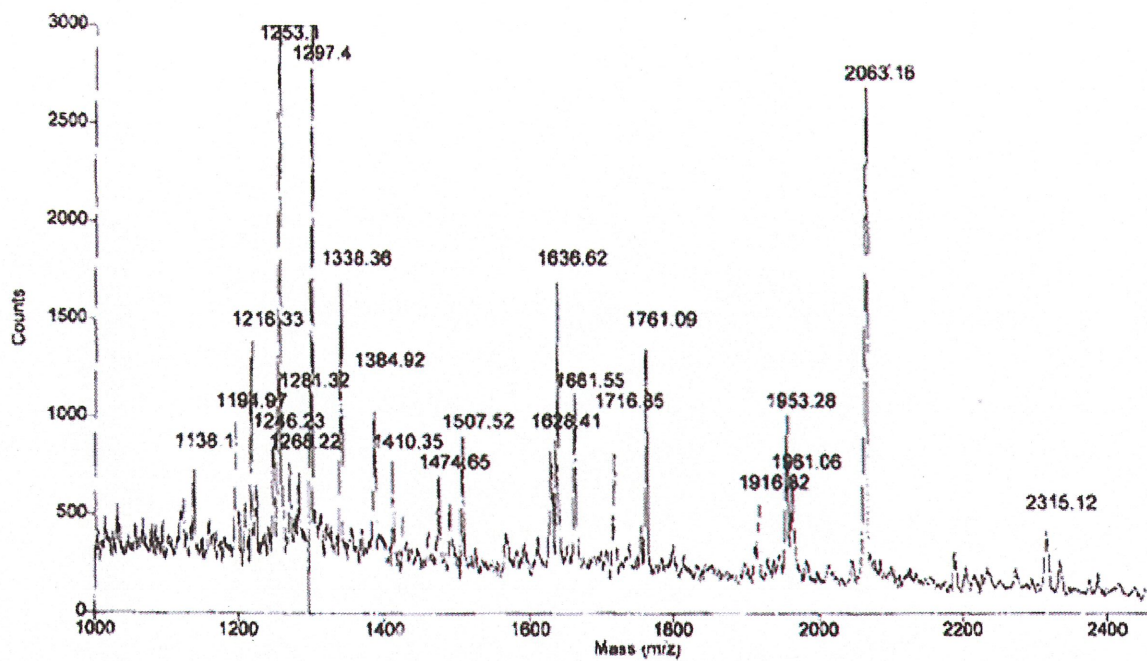


Figure 27. Spectre de masse de la protéine P30 d'environ 30 kDa purifiée par chromatographie d'affinité. Ce spectre a été réalisé par "Le service de séquence de peptides de l'est du Québec" du Centre Hospitalier de l'Université Laval.

## CHAPITRE 3

### DISCUSSION

Depuis plusieurs années, certains groupes de recherche dont les intérêts sont axés sur l'étude de la mécanistique du phénomène de transduction des signaux, ont fait de grandes découvertes relatives à la compréhension de ce processus dans son ensemble. En effet, la littérature fait mention des nombreuses analyses d'expression, d'activation, de localisation et d'interaction d'une multitudes de protéines kinases impliquées dans la signalisation. Ces réalisations ont permis à la communauté scientifique de brosser un tableau général des différentes interrelations qui subsistent entre les membres appartenant aux différents niveaux successifs de la cascade. Certaines kinases ont déjà une étiquette qui leur sont attribuées relativement au rôle qu'elles exercent au sein de la cellule. Cependant, nombreuses sont celles qui à ce jour ne sont caractérisées que d'une façon préliminaire. Or, une compréhension adéquate de ce réseau de communication intracellulaire constitue l'ultime but de cette recherche puisqu'elle est nécessaire à l'amélioration des soins prodigués contre certaines pathologies humaines. Ces pathologies, incluant diverses formes de cancers, résultent en général d'un mauvais fonctionnement dans la transmission de l'information à travers les différentes sous-populations des cellules qui composent un organisme multicellulaire.

Le laboratoire du docteur Blouin tente actuellement de déterminer le rôle physiologique de la protéine kinase ZPK. Diverses études d'expression ont à ce jour permis de suggérer son implication dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Cependant, la poursuite de cette investigation nécessitait d'apporter de nouvelles données qui pourraient s'avérer essentielles non seulement à l'identification de son rôle, mais

également à la compréhension de son mode d'action au sein d'une cellule eucaryote. C'est sous cet optique que mon projet de maîtrise s'est inscrit. L'objectif principal était de vérifier d'une part, la localisation subcellulaire de ZPK et d'autre part, d'examiner la possibilité que notre protéine interagisse avec différents partenaires protéiques par l'entremise de nombreux motifs particuliers, tels que des régions riches en prolines ainsi qu'un double domaine leucine/isoleucine zipper.

### **3.1 La protéine kinase ZPK est localisée au niveau de l'appareil de Golgi**

Puisque la détermination de la localisation subcellulaire d'une protéine kinase offre certains indices quant aux rôles biologiques potentiels qu'elle pourrait exercer au sein d'une cellule, nous avons dans un premier temps caractérisé, au moyen de techniques biochimiques et microscopiques variées, celle de la protéine ZPK endogène dans les cellules NIH 3T3. Les résultats de cette étude ont démontré que la protéine était spécifiquement localisée au niveau de l'appareil de Golgi. En effet, outre les observations faites par microscopie, ZPK a été copurifié sur gradient de Percoll avec la mannosidase II (ManII), une enzyme localisée au Golgi et plus précisément dans la lumière du saccule médian (Darnel *et al.*, 1993). L'extraction au Triton X-114 d'une préparation membranaire de NIH 3T3 ainsi qu'une digestion à la trypsine ont ensuite permis de constater son association avec la surface externe des membranes, du côté cytoplasmique. En effet, l'extraction au Triton X-114 a entraîné la répartition complète de la protéine ZPK dans la phase aqueuse suggérant ainsi qu'il s'agissait d'une protéine hydrophilique, puisque cette méthode, élaborée par Bordier (1981), permettait de séparer les protéines hydrophiliques des protéines amphiphiliques. Ces dernières, contrairement aux protéines hydrophiliques, sont caractérisées par la présence d'un domaine hydrophobe susceptible d'interagir directement avec le corps hydrophobe de la bicouche lipidique. Or, la présence d'un détergent nonionique, tel que le Triton X-114, occasionne une solubilisation qui se traduit par le remplacement de la plupart des molécules lipidiques en contact avec les domaines hydrophobes des protéines amphiphiliques, par des molécules de

détergent (Helenius et Simons, 1975; Tanford et Reynolds, 1976). Il en résulte ainsi la formation de micelles solubles mixtes comportant les protéines amphipatiques en association avec le détergent. Par contre, les protéines hydrophiliques ainsi que les protéines solubles en solution aqueuse, sont de par leurs propriétés physicochimiques peu ou pas influencées par la présence d'un tel détergent dans la solution et donc ne forment aucun micelle, ce qui permet alors de les récupérer dans la phase aqueuse après l'extraction (Helenius et Simons, 1975). La digestion complète de la protéine kinase ZPK en présence de trypsine a, quant à elle, démontré sa disposition topographique. Le résultat a permis de constater que son association aux membranes de l'appareil de Golgi était du côté cytoplasmique, étant donné que l'intégrité de la ManII, sous ces mêmes conditions, était demeurée intacte. De plus, d'autres analyses faisant intervenir différentes procédures d'extraction ont suggéré que la protéine ZPK était fortement associée aux membranes même en présence de 1M NaCl, 1M KCl ou 0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11.5. C'est ainsi que nous avons proposé, tout en prenant en considération les diverses études biochimiques et microscopiques ayant menées à la localisation de ZPK au Golgi, qu'il s'agissait d'une protéine périphérique associée à la face cytosolique des membranes de l'appareil. L'absence de séquence signal ou de domaine transmembranaire au sein de la séquence primaire de ZPK vient corroborer cette proposition (Blouin *et al.*, 1996).

### **3.2 ZPK et son association aux membranes de l'appareil de Golgi**

Considérant l'absence d'un domaine hydrophobe au sein de la séquence primaire de ZPK, on peut s'interroger à savoir par quel moyen cette protéine kinase peut s'associer aux membranes. La possibilité que cette association soit médiée par l'intermédiaire d'une ancre lipidique (myristoylation, palmitoylation, farnesylation,...) est plutôt faible puisque ceci irait à l'encontre du résultat obtenu suite à l'extraction d'une préparation membranaire de cellules NIH 3T3, au Triton X-114 (Bordier, 1981). En effet, notre protéine serait alors demeurée dans la phase détergent puisque ces lipides agissent en tant qu'ancre hydrophobe fixant la

protéine aux membranes (Lehninger *et al.*, 1993). Par conséquent, son association à l'appareil de Golgi doit donc être le résultat d'une interaction protéine-protéine avec la portion cytoplasmique d'une protéine amphiphilique, elle-même ancrée au niveau du Golgi. Or ZPK, au même titre que les autres membres de la famille des MLKs, possèdent certains motifs particuliers susceptibles d'être impliqués dans de nombreuses interactions protéine-protéine dont plusieurs régions riches en prolines situées de part et d'autre du domaine catalytique ainsi qu'un double domaine de dimérisation de type "leucine/isoleucine zipper" (Reddy and Pleasure, 1994; Holzman *et al.*, 1994). En effet, il a été démontré que MLK2/MST et MLK3/SPRK/PTK1, par exemple, étaient capables d'interagir *in vitro* avec de petites GTPases, soit Rac et Cdc42, lesquelles étant des activateurs de la voie des JNKs et de p38 (Teramoto *et al.*, 1996; Nagata *et al.*, 1998). C'est ainsi que nous avons émis notre hypothèse, l'objectif principal étant de purifier, d'identifier et de caractériser un partenaire protéique capable d'interagir spécifiquement avec ZPK. Cette découverte pourrait alors nous informer un temps soit peu sur le mécanisme d'action de ZPK et peut-être même de l'importance de son association aux membranes de l'appareil de Golgi. En effet, la littérature offre plusieurs exemples relatant l'importance de la compartimentalisation subcellulaire de certaines molécules impliquées dans la transduction des signaux. Il semblerait que cette compartimentalisation serait essentielle, voire cruciale, à l'établissement de leur fonction, puisque l'utilisation d'inhibiteurs particuliers empêchant l'interaction entre une kinase et sa protéine d'ancrage préviendrait son action (Mochly-Rosen, 1995; Pawson et Scott, 1997). Contrairement à certaines enzymes constitutivement associées à leur organelle, il existe une multitude d'exemples à travers la littérature qui démontrent que la propagation du signal peut dépendre d'un changement dans la localisation subcellulaire d'une protéine particulière (Cohen *et al.*, 1995; Prestle *et al.*, 1996). L'activation de la voie de Ras par des récepteurs à facteurs de croissance constitue le paradigme de cette dépendance. Lorsque le récepteur à EGF est activé par son agoniste, il s'en suit le recrutement du complexe Grb2/Sos au niveau de la membrane plasmique. Sos, maintenant à proximité de Ras, peut entraîner son activation, puisque le recrutement de Sos a permis d'augmenter sa concentration locale au niveau de la membrane et ainsi devenir effective pour stimuler Ras (Cohen *et al.*, 1995). La

PLC- $\gamma$ 1, la PI3K, ERK, PKA, PKC, Raf et RasGAP sont autant de molécules cytosoliques qui nécessitent une relocalisation pour être en mesure de se rapprocher de leur substrat respectif et ainsi favoriser la transmission du signal en direction du noyau (Mochly-Rosen, 1995; Cohen *et al.*, 1995; Pawson et Scott, 1997). Malgré le fait qu'il manque certaines évidences expérimentales pouvant démontrer l'implication d'un tel mécanisme dans la régulation des membres de la famille des MLKs, Mata (1996) avait observé d'une part, la présence de la protéine ZPK autant dans la fraction cytosolique que dans les fractions particulières et d'autre part, qu'elle présentait différentes caractéristiques biochimiques dépendantes de sa localisation. En effet, associé aux membranes, ZPK était phosphorylé alors dans la fraction cytosolique, la protéine pouvait à la fois être phosphorylée et non phosphorylée. Ainsi, il est possible de croire, de par le fait qu'elle est probablement activée suite à sa phosphorylation au même titre que différentes protéines kinases appartenant à la cascade des MAPKs, qu'elle nécessiterait une relocalisation au cytoplasme afin de favoriser à la fois son activation et l'établissement de sa fonction.

### **3.3 Identification du partenaire protéique de ZPK**

Pour atteindre mon objectif et ainsi procéder à la purification d'un partenaire protéique capable d'interagir spécifiquement avec ZPK, nous avons dans un premier temps fabriqué une sonde correspondant à l'une de ses régions riches en prolines analogues à celles reconnues par des ligands SH3. À cette fin, nous avons amplifié les 600 premières paires de bases, lesquelles ont ensuite été clonées dans le vecteur d'expression pGEX 2TK. Ce dernier offrait l'avantage de produire en bactéries une protéine fusionnée à la glutathione S-transférase (GST-RRP1), permettant ainsi de la purifier simplement par chromatographie d'affinité. Par la suite, nous avons préparé des fractions membranaires de cellules NIH 3T3 dans le but d'isoler la protéine permettant peut-être de localiser ZPK au niveau des membranes de l'appareil de Golgi. Ces fractions ont été déposées sur gel, puis transférées sur membrane de

PVDF pour ensuite être soumis à une analyse de type Far Western. Les résultats obtenus sont illustrés à la figure 28. En effet, une protéine de 30 kDa (P30) a interagi spécifiquement avec la portion proline riche de ZPK, contrairement au GST qui constitue un contrôle négatif. Cette interaction doit possiblement être médiée soit par la présence d'un domaine SH3, soit par la présence d'un domaine WW/WWP car ceux-ci ont une affinité spécifique pour les régions riches en prolines.

Un spectre de masse a ensuite été effectué sur une préparation de protéines purifiées correspondant au polypeptide ayant interagi spécifiquement avec ZPK (P30), afin de l'identifier. Pour se faire, une digestion à la trypsine a été réalisée. Le patron de bandes ainsi obtenu a été comparé à ceux d'une banque de données. Chaque protéine appartenant à cette banque possède un patron de digestion qui lui est propre, un peu comme une empreinte digitale, permettant ainsi par homologie d'identifier l'inconnue. Or, l'identité de cette protéine d'environ 30 kDa (P30) purifiée par chromatographie d'affinité demeure encore indéterminée. Des analyses de séquence devront donc être effectuées pour poursuivre cette caractérisation.

### **3.4 Mode d'action hypothétique de la protéine kinase ZPK**

La microscopie à immunofluorescence a démontré l'association de la PKC- $\delta$  au niveau de l'appareil de Golgi (Goodnight *et al.*, 1995; Westermann *et al.*, 1996). Fait intéressant, cet isoforme est activé suite à un clivage protéolytique par la caspase 3, laquelle étant l'un des membres de la très grande famille de protéases exerçant un rôle clé au cours des phénomènes d'inflammation et d'apoptose (Emoto *et al.*, 1995; Alnemri *et al.*, 1996; Villa *et al.*, 1997). Or, des travaux récents dans notre laboratoire ont montré que ZPK pouvait potentiellement être clivé de façon spécifique dans les NIH 3T3. Actuellement, on ne connaît pas la



signification physiologique de ce phénomène, mais il est possible de suggérer un mécanisme d'action similaire à celui de la PCK- $\delta$ , par lequel la propagation du signal en direction du noyau serait assurée suite à sa relocalisation au niveau du cytoplasme. Le fait que ZPK présente différentes caractéristiques biochimiques dépendantes de sa localisation vient supporter cette hypothèse (Mata *et al.*, 1996). L'association de ZPK à l'appareil de Golgi par l'entremise d'une protéine d'ancrage, possiblement celle que nous avons purifiée par chromatographie d'affinité, serait donc essentielle dans la régulation de sa fonction.

### 3.5 Perspectives relatives à cette découverte

Puisque nous n'avons pu découvrir l'identité de la protéine P30 capable d'interagir spécifiquement avec la région riche en prolines de ZPK, bon nombre d'expériences devront être réalisées avant d'y parvenir. Différentes approches peuvent être adoptées. D'abord, la détermination de 2 séquences de 20 acides aminés chacune par dégradation d'Edman, serait nécessaire d'une part à la synthèse d'oligonucléotides dégénérescents et d'autre part à la production d'un anticorps. En effet, ces oligos permettraient l'amplification par PCR de l'ADNc correspondant à cette protéine inconnue. Nous pourrions également procéder au criblage d'une banque d'ADNc. Cet ADNc pourrait ensuite être cloné dans un vecteur d'expression de type pGEX de façon à produire en bactéries, une protéine de fusion. Cette dernière aurait alors deux utilités, la deuxième étant dépendante de la première. Nous pourrions d'abord générer un anticorps spécifiquement dirigé contre cette protéine inconnue (P30). Cet anticorps permettrait alors de réaliser des immunoprécipitations à partir d'extraits de cellules NIH 3T3 transfectées, dans le but de vérifier *in vivo* la véracité de l'interaction protéine-protéine entre la protéine P30 et ZPK. Ainsi, une immunoprécipitation à l'aide de l'anti-ZPK ou de l'anti-P30 serait réalisée pour ensuite faire subir aux immunocomplexes un immunobuvardage au moyen de l'anticorps (anti-ZPK ou anti-P30) n'ayant pas servi au cours de l'immunoprécipitation. Différentes études d'expression et de localisation chez diverses lignées cellulaires pourraient également être réalisées. En effet, une immunohistochimie

devrait être effectuée afin de s'assurer que cette protéine inconnue est réellement localisée au niveau du Golgi. Il serait par la suite intéressant de fabriquer plusieurs mutants de délétion de la protéine P30 pour ensuite sélectionner ceux, d'une part, qui peuvent encore s'associer au Golgi sans toutefois interagir avec ZPK et ceux, d'autre part, qui ne peuvent plus s'associer au Golgi mais qui peuvent fixer ZPK. En les transfectant, nous pourrions visualiser le comportement de ZPK endogène et par le fait même le phénotype des cellules qui en résulte. Cette expérience pourrait fournir, par le biais d'un essai d'activation, des informations sur l'importance de la localisation subcellulaire de la protéine kinase ZPK médiée par la protéine d'ancrage P30.

Le séquençage complet de cet ADNc permettrait possiblement aussi, d'identifier la présence de certaines régions consensus caractéristiques des différentes protéines que composent une cellule. Ainsi nous serions en mesure de vérifier l'existence d'un motif SH3 ou WW/WWP permettant d'expliquer l'interaction spécifique avec la portion riche en prolines de ZPK. Des études d'activation pourront aussi être réalisées dans la mesure où cette protéine inconnue possède un domaine catalytique. S'il s'agit tout simplement d'une protéine d'ancrage sans activité intrinsèque, seules différentes procédures d'extraction (section du matériel et méthodes) pourront être effectuées dans le but de caractériser son association au niveau de l'appareil de Golgi (si elle est au Golgi), à savoir si cette localisation est le résultat de la présence d'un domaine transmembranaire ou d'une ancre lipidique (myristoylation, palmitoylation, prénylation,...).

### **3.6 ZPK et la biogénèse et/ou le transport des vésicules?**

La localisation de ZPK au niveau de l'appareil de Golgi chez différentes lignées cellulaires (NIH 3T3, Swiss 3T3, P19 et AtT-20) soulève la possibilité d'une implication fonctionnelle au sein des différents événements menant à la régulation de la biogénèse et/ou le

transport vésiculaire. Cette éventualité peut être appuyée par certaines découvertes réalisées récemment. En effet, Nagata (1998) a observé la localisation de la protéine MLK2/MST au niveau de structures vésiculaires situées le long des microtubules dans des cellules fibroblastiques. En utilisant le système des deux hybrides, ils ont identifié plusieurs protéines capables d'interagir spécifiquement avec MLK2/MST dont certaines (KIF3 et KAP3A) faisant partie de la très grande famille des kinésines. Ces protéines cytoplasmiques jouent un rôle critique dans le transport intracellulaire propagé en direction de la périphérie, puisqu'elles servent de moteur moléculaire dans le glissement des vésicules le long des microtubules, suite à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (Darnel *et al.*, 1993; Lippincott-Schwartz, 1998). Parce que la direction du mouvement des vésicules le long des microtubules est contrôlée par la cellule, l'activité de ces moteurs moléculaires doivent absolument être régulée. De récentes études ont démontré que les membres de la très grande famille des kinésines peuvent être phosphorylés, suggérant ainsi la possibilité qu'un changement dans leur état de phosphorylation pourrait modifier leur habileté à interagir soit avec les microtubules, soit avec les vésicules (Davidson *et al.*, 1992; Haimo, 1995). Cette modification permettrait alors la régulation positive ou négative du transport vésiculaire intracellulaire. Cependant, l'identité des protéines kinases directement ou indirectement responsables de cette régulation demeure encore obscure (Davidson *et al.*, 1992). Certaines évidences semblent toutefois proposer l'implication de la PKA et de la PKC au sein des processus d'exocytose (Buccione *et al.*, 1994) de transcytose (Hansen *et al.*, 1994), ainsi que dans la formation des vésicules de transport consacrées à la voie de sécrétion constitutive (Westermann *et al.*, 1996; Muñoz *et al.*, 1997).

### **3.7 Perspectives relatives à l'implication de ZPK dans la modulation des fonctions du Golgi**

Pour être en mesure de vérifier l'implication possible de ZPK dans la modulation des différentes fonctions associées à l'appareil de Golgi, différentes manipulations devront être réalisées et/ou refaites sous des conditions optimales. Ces expériences classiques ont déjà été

effectuées pour déterminer le rôle de la PKC, une protéine kinase spécifiquement localisée au Golgi, dans la régulation des divers processus reliés à cet organelle (Buccione *et al.*, 1994; Lehel *et al.*, 1995; Westermann *et al.*, 1996; Prestle *et al.*, 1996). En effet, basé sur le principe que l'appareil de Golgi constitue le site exclusif des réactions de sulfatation, il est possible de suivre la sécrétion constitutive des protéines par l'incorporation de sulfate radioactif aux glucosaminoglycanes (GAGs), des hétéropolysaccharides (Lehninger *et al.*, 1993; Prestle *et al.*, 1996). L'établissement d'une cinétique de relâchement des GAGs dans le milieu permet ainsi la détermination de l'implication d'une protéine, en l'occurrence la PKC, dans la modulation des fonctions caractéristiques de l'appareil de Golgi (Lehel *et al.*, 1995). Dès lors, nous pourrions vérifier l'implication de ZPK dans la sécrétion en transfectant à la fois des cellules NIH 3T3 avec le vecteur contenant la séquence encodant ZPK et le vecteur vide, de façon à visualiser une corrélation entre le taux de sécrétion des GAGs et la présence ou non de la protéine d'intérêt. Cette expérience a déjà été réalisée dans le laboratoire, toutefois elle ne nous a donné aucune évidence relativement à l'implication de ZPK. Les conditions avec lesquelles nous avons effectué cette expérience n'étaient pas établies dans le laboratoire. Il serait donc nécessaire, avant d'exclure définitivement la possibilité que ZPK régule la sécrétion, de refaire cette manipulation.

D'autre part, le transport du sulfate radioactif dans la cellule et éventuellement dans le Golgi, peut également contribuer à la détermination de l'implication d'une protéine dans la modulation des diverses fonctions reliées au Golgi (Prestle *et al.*, 1996). L'augmentation de l'entrée du sulfate dans une cellule transfectée avec le vecteur comprenant la séquence encodant la protéine d'intérêt, comparativement à une cellule transfectée avec le vecteur vide, permet également de suggérer l'implication de cette protéine dans la sécrétion constitutive des protéines (Prestle *et al.*, 1996).

Finalement, la transfection ou non de ZPK dans des cellules infectées avec le VSV ("Vesicular Stomatitis Viral") thermosensible permettrait également de vérifier son

implication dans la sécrétion. En effet, ce virus a tendance à s'accumuler au niveau du TGN lorsque les cellules sont incubées à 20°C, contrairement à une incubation à 37°C qui favorise son déplacement en direction de la membrane plasmique (Müsch *et al.*, 1996; Muñiz *et al.*, 1997). Cette caractéristique peut alors être mis à profit pour étudier l'effet d'une kinase particulière sur la sécrétion constitutive des protéines, en l'occurrence le virus. À cette fin, les cellules infectées doivent absolument être marquées à la méthionine <sup>35</sup>S (pulse) pendant un court laps de temps pour ensuite être lavées et incubées quelques heures à 20°C (chase). Ainsi, les virus pourront facilement être détectés.

## CONCLUSION

La réalisation de mon projet de maîtrise a permis d'élargir le champ des connaissances relativement à la protéine sérine/thréonine kinase ZPK/DLK/MUK. Les résultats obtenus fournissent des indices permettant de suggérer l'un des rôles biologiques qu'elle pourrait exercer au sein d'une cellule eucaryote.

Le premier objectif consistait à déterminer la localisation subcellulaire de la forme endogène de ZPK dans les cellules NIH 3T3, par l'utilisation de techniques biochimiques et microscopiques variées. C'est ainsi que ZPK a été localisé spécifiquement au niveau de l'appareil de Golgi. Cette constatation offre une évidence d'une particulière importance dans l'établissement de l'un de ses rôles biologiques, à savoir son implication dans la modulation des fonctions caractéristiques de l'appareil de Golgi, tels que la biogénèse et/ou le transport des vésicules. Cette suggestion devra maintenant faire l'objet d'une étude approfondie, ce qui ouvre la voie à la réalisation de nombreuses expériences qui permettront de vérifier cette nouvelle hypothèse et peut-être même de l'approuver.

Le second objectif de mon projet de maîtrise était à la fois l'identification, la purification ainsi que la caractérisation d'un partenaire protéique capable d'interagir spécifiquement avec la portion proline riche de la protéine kinase ZPK. Pour réaliser cet objectif nous avons, dans un premier temps, procédé à la synthèse d'une protéine de fusion correspondant à la région riche en prolines localisée du côté amino-terminal. La protéine ainsi produite nous a permis par la suite d'identifier une protéine d'environ 30 kDa susceptible d'interagir avec ZPK. Cependant, nous n'avons pu malheureusement caractériser davantage cette protéine avant la fin de ma maîtrise, puisqu'il s'agissait suite au résultat

obtenu par spectre de masse, d'une protéine inconnue. S'agit-il d'une simple protéine d'ancrage sans activité catalytique intrinsèque permettant de localiser ZPK à proximité de ses substrats? Peut-être. De nombreuses manipulations devront donc être réalisées avant d'être en mesure de comprendre l'importance d'une telle association.

Il est clair que la localisation par le biais d'interactions protéine-protéine est une composante essentielle de la transduction des signaux et qui plus est, fourni un important moyen de régulation (Mochley-Rosen, 1995). Les différentes réponses cellulaires engendrées par d'innombrables agents extracellulaires sont organisées et coordonnées non seulement à travers ces interactions protéine-protéine, mais également à travers des interactions protéine-phospholipides spécifiques, généralement par le biais des motifs protéiques conservés (Pawson et Scott, 1997). Ces associations assurent donc une certaine spécificité dans la réponse. Plusieurs études ont même démontré que les inhibiteurs de telles interactions entre une kinase et sa protéine d'ancrage pourraient devenir des agents thérapeutiques très utiles et sans doute très puissants (Mochly-Rosen, 1995). Ainsi, il est possible de croire que la localisation subcellulaire de la protéine kinase ZPK par l'intermédiaire d'une interaction protéine-protéine lui permet d'être régulée au même titre que plusieurs protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire. Je crois que les résultats obtenus au cours de mon travail de maîtrise ouvrent la voie à une meilleure compréhension de la protéine sérine/thréonine kinase ZPK.

## ANNEXE 1

**Tableau 1. Les acides aminés et leur symbole.**

ACIDES AMINÉS			CODONS			
A	Ala	Alanine	GCA	GCC	GCG	GCTC
C	Cys	Cystéine	TGC	TGT		
D	Asp	Aspartate	GAC	GAT		
E	Glu	Glutamate	GAA	GAG		
F	Phe	Phénylalanine	TTC	TTT		
G	Gly	Glycine	GGA	GGC	GGG	GGT
H	His	Histidine	CAC	CAT		
I	Ile	Isoleucine	ATA	ATC	ATT	
K	Lys	Lysine	AAA	AAG		
L	Leu	Leucine	TTA	TTG	CTA	CTC CTG CTT
M	Met	Méthionine	ATG			
N	Asn	Asparagine	AAC	AAT		
P	Pro	Proline	CCA	CCC	CCG	CCT
Q	Gln	Glutamine	CAA	CAG		
R	Arg	Arginine	AGA	AGG	CGA	CGC CGG CGT
S	Ser	Sérine	AGC	AGT	TCA	TCC TCG TCT
T	Thr	Thréonine	ACA	ACC	ACG	ACT
V	Val	Valine	GTA	GTC	GTG	GTT
W	Trp	Tryptophane	TGG			
Y	Tyr	Tyrosine	TAC	TAT		



## BIBLIOGRAPHIE

ALNEMRI, E.S., LIVINGSTON, D.J., NICHOLSON, D.W., SAVESEN, G., THORNBERRY, N.A., WONG, W.W., ET YUAN, J. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171.

BAR-SAGI, D., ROTIN, D., BATZER, A., MANDIYAN, V., ET SCHLESSINGER, J. 1993. SH3 domains direct cellular localization of signaling molecules. *Cell* 74: 83-91.

BEAUDOUIN, J., NADEAU, A., BERGERON, P., GRONDIN, G., ET BLOUIN, R. 1994. Identification of a novel putative protein kinase preferentially expressed in brain and the pancreas. *Mol. Biol. Cell* 5: 150a.

BERGERON, P., DOUZIECH, M., DAIGLE, N., ET BLOUIN, R. 1997. Inhibition of cell growth by overexpression of the *ZPK* gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231: 153-155.

BERNARDS, A. 1991. Predicted tyk2 protein contains two tandem protein kinase domains. *Oncogene* 6: 1185-1187.

BLOUIN, R., BEAUDOIN, J., BERGERON, P., NADEAU, A., ET GRONDIN, G. 1996. Cell-specific expression of *ZPK* gene in adult mouse tissues. *DNA Cell Biol.* 15: 631-642.

BORDIER, C. 1981. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* 256: 1604-1607.

BORK, P., SHULTZ, J., ET PONTING, C.P. 1997. Cytoplasmic signalling domains : the next generation. *Trends Biochem. Sci.* 22: 296-298.

BOURNE, H.R., SANDERS, D.A., ET MCCORMICK, F. 1991. The GTPase superfamily : conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349: 117-127.

BUCCIONE, R., DI TULLIO, G., CARETTA, M., MARINETTI, M.R., BIZZARRI, C., FRANCAVILLA, S., LUINI, A., ET DE MATTEIS, A. 1994. Analysis of protein kinase C requirement for exocytosis in permeabilized rat basophilic leukaemia FBL-2H3 cells : a GTP-binding protein(s) as a potential target for protein kinase C. *Biochem. J.* 298: 149-156.

BURBELO, P.D., DRECHSEL, D., ET HALL, A. 1995. A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. *J. Biol. Chem.* 270: 29071-29074.

CLAPHAM, D.E., ET NEER, E.J. 1993. New roles for G-protein  $\beta\gamma$ -dimers in transmembrane signalling. *Nature* 365: 403-406.

CICCHETTI, P., MAYER, B.J., THIEL, G., ET BALTIMORE, D. 1992. Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-Rho. *Science* 257: 803-806.

COLEMAN, D.E., BERGHUIS, A.M., LEE, E., LINDER, M.E., GILMAN, A.G., ET SPRANG, S.R. 1994. Structures of active conformations of  $G_{i\alpha 1}$  and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science* 265: 1405-1412.

CLEMENS, M.J., TRAYNER, I., ET MENAYA, J. 1992. The role of protein kinase C isoenzymes in the regulation of cell proliferation and differentiation. *J. Cell Sci.* 103: 881-887.

CHAN, D.C., BREDFORD, M.T., ET LEDER, P. 1996. Formin binding proteins bear WWP/WW domains that bind prolin-rich peptides and functionally resemble SH3 domains. *EMBO J.* 15: 1045-1054.

CHOI, K-Y., SATTERBERG, B., LYONS, D.M., ET ELION, E.A. 1994. Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell* 78: 499-512.

COHEN, G.B., REN, R., ET BALTIMORE, D. 1995. Molecular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* 80: 237-248.

CRESPO, P., XU, N., SIMONDS, W.F., AND GUTKIND, J.S. 1994. Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein  $\beta\gamma$  subunits. *Nature* 369: 418-420.

CUENDA, A., ET DOROW, D.S. 1998. Differential activation of stress-activated protein kinase kinases SKK4/MKK7 and SKK1/MKK4 by the mixed-lineage kinase-2 and mitogen-activated protein kinase kinase (MKK) kinase-1. *Biochem. J.* 333: 11-15.

DAIGLE, N. 1998. Analyse de l'expression du gène *ZPK* dans la lignée de cellules P19 et production d'un anticorps. Université de Sherbrooke. Sherbrooke. 67p.

DARNELL, J., LODISH, H., ET BALTIMORE, D. 1993. *Biologie moléculaire de la cellule*. De Boeck-Wesmael. Bruxelles. 1102p.

DAVIDSON, H.W., MCGOWAN, C.H., ET BALCH, W.E. 1992. Evidence for the regulation of exocytic transport by protein phosphorylation. *J. Cell. Biol.* 116: 1343-1355.

DAVIS, R.C. 1993. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 268: 14553-14556.

DENHARDT, D.T. 1996. Signal transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell : the potential for multiplex signalling. *Biochem. J.* 318: 729-747.

DHANASEKARAN, N., ET PREMKUMAR REDDY, E. 1998. Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene* 17: 1447-1455.

DOROW, D.S., DEVEREUX, L., DIETSCH, E., ET DE KRETZER, T. 1993. Identification of a new family of human epithelial protein kinases containing two leucine/isoleucine-zipper domains. *Eur. J. Biochem.* 213: 701-710.

DOUVILLE, E., DUNCAN, P., ABRAHAM, N., ET BELL, J.C. 1994. Dual specificity kinases - a new family of signal transducers. *Cancer Metastasis Rev.* 13: 1-7.

DOUZIECH, M., GRONDIN, G., LORANGER, A., MARCEAU, N., ET BLOUIN, R. 1998. Zonal induction of mixed lineage kinase ZPK/DLK/MUK gene expression in regenerating mouse liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249: 927-932.

ELION, E.A. 1998. Routing MAP kinase cascades. *Science* 281: 1625-1626.

EMOTO, Y., MANOME, Y., MEINHARDT, G., KISAKI, H., KHARBANDA, S., ROBERTSON, M., GHAYUR, T., WONG, W.W., KAMEN, R., WEICHSELBAUM, R., ET KUFE, D. 1995. Proteolytic activation of protein kinase C  $\delta$  by an ICE-like protease in apoptotic cells. *EMBO J.* 14: 6148-6156.

EZOE, K., LEE, S., STRUNK, K.M., ET SPRITZ, R.A. 1994. PTK1, a novel protein kinase required for proliferation of human melanocytes. *Oncogene* 9: 935-938.

FAN, G., MERRITT, S.E., KORTENJANN, M., SHAW, P.E., ET HOLZMAN, L.B. 1996. Dual leucine zipper-bearing kinase (DLK) activates p46<sup>SAPK</sup> and p38<sup>MAPK</sup> but not ERK2. *J. Biol. Chem.* 271: 24788-24793.

FANGER, G.R., GERWINS, P., WIDMANN, C., JARPE, M.B., ET JOHNSON, G.L. 1997. MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and Tpls : upstream regulators of the c-jun amino-terminal kinases? *Curr. Opin. Gen. Dev.* 7: 67-74.

FAUX, M.C., ET SCOTT, J.D. 1996. More target with protein phosphorylation conferring specificity by location. *Trends Biochem. Sci.* 21: 312-315.

FUKUDA, M., GOTOH, Y., ET NISHIDA, E. 1997. Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase : its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *EMBO J.* 16: 1901-1908.

GOOGNIGHT, J., MISCHAK, H., KOLCH, W., ET MUSHINSKI, J.F. 1995. *J. Biol. Chem.* 270: 9991-10001.

HAIMO, L.T. 1995. Regulation of kinesin-directed movements. *Trends Cell Biol.* 5: 165-168.

HANKS, S.K., QUINN, A.M., ET HUNTER, T. 1988. The protein kinase family : Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241: 42-52.

HANKS, S.K., ET HUNTER, T. 1995. The eukaryotic protein kinase superfamily : kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9: 576-596.

HANKS, S.K., QUINN, A.M., ET HUNTER, T. 1988. The protein kinase family : conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241: 42-52.

HANSEN, S.H., ET CASANOVA, J.E. 1994. Gs $\alpha$  stimulates transcytosis and apical secretion in MDCK cells through cAMP and protein kinase A. *J. Cell Biol.* 126: 677-687.

HASLAM, R.J., REN, R., CLARK, K., ET HEMMING, B.A. 1993. Pleckstrin domain homology. *Nature* 363: 309-310.

HELDIN, C-H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. 1995. *Cell* 80: 213-223.

HELENIUS, A., ET SIMONS, K. 1975. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* 415: 29-79.

HELDIN, C-H. ET PURTON, M. 1996. Signal transduction. Chapman & Hall. Falmouth. 360p.

HIRAI, S-I., IZAWA, S-I., SPYROU, G., ET OHNO, S. 1996. Activation of the JNK pathway by distantly related protein kinases, MEKK and MUK. *Oncogene* 12: 641-650.

HIRAI, S-I., KATOH, M., TERADA, M., KYRIAKIS, J.M., ZON, L.I., RANA, A., AVRUCH, J., ET OHNO, S. 1997. MST/MLK2, a member of the mixed lineage kinase family, directly phosphorylates and activates SEK1, an activator of c-jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 272: 15167-15173.

HIRAI, S-I., NODA, K., MORIGUCHI, T., NISHIDA, E., YAMASHITA, A., DEYAMA, T., FUKUYAMA, K., ET OHNO, S. 1998. Differential activation of two JNK activators, MKK7 and SEK1 by MKN28-derived nonreceptor serine/threonine kinase/mixed lineage kinase 2. J. Biol. Chem. 273: 7406-7412.

HOLZMAN, L.B., MERRITT, S.E., ET FAN, G. 1994. Identification, molecular cloning, and characterization of Dual Leucine Bearing Kinase. J. Biol. Chem. 269: 30808-30817.

GALLO, K.A., MARK, M.R., SCADDEN, D.T., WANG, Z., GU, Q., ET GODOWSKI, P.J. 1994. Identification and characterization of SPRK, a novel *src*-homology 3 domain-containing proline-rich kinase with serine/threonine kinase activity. J. Biol. Chem. 269: 15092-15100.

IHLE, J.N., ET KERR, I.M. 1995. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. Trends Genet. 11: 69-74.

ING, Y.L., LEUNG, I.W.L., HENG, H.H.Q., TSUI, L., ET LASSAM, N.J. 1994. MLK-3 : identification of a widely-expressed protein kinase bearing an SH/ domain and a leucine zipper-basic region domain. Oncogene 9: 1745-1750.

JARPE, M.P., WIDMANN, C., KNALL, C., SCHLESINGER, T.K., GIBSON, S., YUJIRI, T., FANGER, G.R., GELFAND, E.W., ET JOHNSON, G.L. 1998. Anti-apoptotic versus proapoptotic signal transduction : Checkpoints and stop signs along the road to death. Oncogene 17: 1475-1482.

JONHSON, L.N., NOBLE, M.E.M., ET OWEN, D.J. 1996. Active and inactive protein kinase : structural basis for regulation. Cell 85: 149-158.

KIEFER, F., TIBBLES, L.A., ANAFI, M., JANSSEN, A., ZANKE, B.W., LASSAM, N., PAWSON, T., WOODGETT, J.R., ET ISCOVE, N.N. 1996. HPK1, a hematopoietic protein kinase activating the SAPK/JNK pathway. EMBO J. 15: 7013-7025.

KIEFER, F., TIBBLES, L.A., LASSAM, N., ZANKE, B., ISCOVE, I., ET WOODGETT, R. 1997. Regulation of transcription and translation. Biochem. Soc. Trans. 25: 491-498.

KISHIMOTO, T., TAGA, T., ET AKIRA, S. 1994. Cytokines signal transduction. *Cell* 76: 253-262.

KOCH, C.A., ANDERSON, D., MORAN, M.F., ELLIS, C., ET PAWSON, T. 1991. SH2 and SH3 domains : elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 252: 668-673.

KYRIAKIS, J.M., ET AVRUCH, J. 1996. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *BioEssays* 18: 567-577.

LAMBRIGHT, D.G., NOEL, J.P., HAMM, H.E., ET SIGLER, P.B. 1994. Structural determinants for activation of the  $\alpha$ -subunit of heterotrimeric G protein. *Nature* 369: 621-628.

LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., ET COX, M.M. 1993. *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers. New York. 1013p.

LEUNG, I.W-L., ET LASSAM, N. 1998. Dimerization via tandem leucine zippers is essential for the activation of the mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MLK-3. *J. Biol. Chem.* 273: 32408-32415.

LINDER, M.E., ET GILMAN, A.G. 1992. G proteins. *Sci. Am.* 56-65.

LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. 1998. Cytoskeletal proteins and golgi dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 52-59.

MADHANI, H.D., ET FINK, G.R. 1998. The riddle of MAP kinase signaling specificity. *Trends Genet.* 14:151-155.

MALARKEY, K., BELHAM, C.M. PAUL, A., GRAHAM, A., MCLEES, A., SCOTT, P.H., ET PLEVIN, R. 1995. The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.* 309: 361-375.

MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., ET SAMBROOK, J. 1982. Molecular cloning : a laboratory manual. Editeurs : Cold Spring Harbor, NY. Cold spring Harbor Laboratory. 545p.

MARSHALL, C.J. 1994. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4: 82-89.

MATA, M., MERRIT, S.E., FAN, G., GENG, YU, G.G., ET HOLZMANN, L.B. 1996. Characterization of dual leucine zipper-bearing kinase, a mixed lineage kinase present in synaptic terminals whose phosphorylation is regulated by membrane depolarization via calcineurin. *J. Biol. Chem.* 269: 16888-16896.

MAYER, B.J. ET BALTIMORE, D. 1993. Signalling through SH2 and SH3 domains. *Trends Cell Biol.* 3: 8-13.

MOCHLY-ROSEN, D. 1995. Localization of protein kinase by anchoring proteins : a theme in signal transduction. *Science* 268: 247-251.

MORAND, J.N., ET KENT, C. 1986. A one-step technique for the subcellular fractionation of total cell homogenates. *Anal. Biochem.* 159: 157-162.

MUÑIZ, M., MARTIN, M.E., HIDALGO, J., ET VELASCO, A. 1997. Protein kinase A activity is required for budding of constitutive transport vesicles from the trans-golgi network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14461-1466.

MÜSCH, A., XU, H., SHIELDS, D., ET RODRIGUEZ-BOULAN, E. 1996. Transport of vesicular stomatitis virus G protein to the cell surface is signal mediated in polarized and nonpolarized cells. *J. Cell Biol.* 133: 543-558.

NADEAU, A., GRONDIN, G., ET BLOUIN, R. 1997. *In situ* hybridization analysis of *ZPK* gene expression during murine embryogenesis. *J. Histochem. Cytochem.* 45: 107-118.

NAGATA, K-I., PULS, A., FUTTER, C., ASPENSTROM, P., SCHAEFER, E., NAKATA, T., HIROKAWA, N., ET HALL, A. 1998. The MAP kinase kinase kinase MLK2 co-localizes with activated JNK along microtubules and associated with kinesin superfamily motor KIF3. *EMBO J.* 17: 149-158.



NEER, E.J. 1995. Heterotrimeric G proteins : Organizers of transmembrane signals. *Cell* 80: 249-257.

NOËL, J.P., HAMM, H.E., ET SIGLER, P.B. 1993. The 2.2°A crystal structure of transducin- $\alpha$  complexed with GTP $\gamma$ S. *Nature* 366: 654-663.

PAUL, A., WILSON, S., BELHMAN, C.M., ROBINSON, C.J.M., SCOTT, P.H., GOULD, G.W., ET PELVIN, R. 1997. Stress-activated protein kinases : Activation, regulation and function. *Cell. Signal.* 9: 403-410.

PAWSON, T., ET HUNTER, T. 1994. Oncogenes and proliferation : Signal transduction and growth control in normal and cancer cells. *Cur. Opin. Genet. Dev.* 4: 1-4.

PAWSON, T., ET SCHLESSINGER, J. SH2 and SH3 domains. 1993. *Curr. Biol.* 3: 434-441.

PAWSON, T., ET SCOTT, D. 1997. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278: 2075-2080.

PAWSON, T. 1995. Protein modules and signalling networks. *Nature* 373: 573-580.

PELHAM, H.R. 1991. Multiple targets for brefeldin A. *Cell* 67: 449-451.

PRESTLE, J., PFIZENMAIER, K., BRENNER, J., ET JOHANNES, F.-J. 1996. Protein kinase C  $\mu$  is located at the golgi compartment. *J. Cell Biol.* 134: 1401-1410.

RANA, A., GALLO, K., GODOWSKI, P., HIRAI, S.-I., OHNO, S., ZON, L., KYRIAKIS, J.M., ET AVRUCH, J. 1996. The mixed lineage kinase SPRK phosphorylates and activates the stress-activated protein kinase activator, SEK-1. *J. Biol. Chem.* 271: 19025-19028.

READY, U.R., ET PLEASURE, D. 1994. Cloning of a novel putative protein kinase having a leucine zipper domain from brain human brain. *Biochem. Res. Commun.* 202: 613-620.

ROBINSON, M.J., ET COBB, M.H. 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 180-196.

SAKUMA, H., IKEDA, A., OKA, S., KOZUTSUMI, Y., ZANETTA, J., ET KAWASAKI, T. 1997. Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding a new member of mixed lineage protein kinase from human brain. *J. Biol. Chem.* 272: 28622-28629.

SCHAEFFER, H.J., CATLING, A.D., SCOTT, T.E., COLLIER, L., KRAUSS, A., ET WEBER, M.J. 1998. MP1 : a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science* 281: 1668-1671.

SCHLESSINGER, J., ET ULLRICH, A. 1992. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* 9: 383-391.

SCHLESSINGER, J. SH2/SH3 signaling proteins. 1994. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4: 25-30.

SCHWARTZBERG, P.L. 1998. The many faces of Src : multiple functions of a prototypical tyrosine kinase. *Oncogene* 17: 1463-1468.

SEGER, R., ET KREBS, E.G. 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9: 726-735.

SHAW, G. 1996. The pleckstrin homology domain : an intriguing multifunctional protein module. *BioEssays* 18: 35-46.

STRADER, C .D., FONG, T.M., TOTA, M.R., ET UNDERWOOD, D. 1994. Structure and function of G-protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 101-132.

SU, Y.-C., HAN, J., XU, S., COBB, M., ET SKOLNIK, Y. 1997. NIK is a new Ste-20-related kinase that binds NCK and MEKK1 and activates the SAPK/JNK cascade via a conserved regulatory domain. *EMBO J.* 16: 1279-1290.

SUDOL, M. 1996. The WW module competes with the SH3 domain? *Trends Biochem. Sci.* 21: 161-163.

SUDOL, M. 1998. From Src homology domains to other signaling modules : proposal of the "protein recognition code". *Oncogene* 17: 1469-1474.

SUGDEN, P.H., ET CLERK, A. 1997. Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell. Signal.* 9: 337-351.

TAGA, T., ET KISHIMOTO, T. 1993. Cytokine receptors and signal transduction. *FASEB J.* 7: 3387-3396.

TANFORD, C., ET RENYNOLDS, J.A. 1976. Characterization of membrane proteins in detergent solutions. *Biochim. Biophys. Acta* 457: 133-170.

TANIGUCHI, T. 1995. Cytokine signaling through non receptor protein tyrosine kinases. *Science* 268: 251-255.

TAYLOR, S.S., RADZIO-ANDZELM, E., ET HUNTER, T. 1995. How do protein kinases discriminate between serine/threonine and tyrosine? Structural insights from the insulin receptor protein-tyrosine kinase. *FASEB J.* 9: 1255-1266.

TERAMOTO, H., COSO, O.A., MIYATA, H., IGISHI, T., MIKI, T., ET GUTKIND, S. 1996. Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to c-jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 271: 27225-27228.

TIBBLES, L.A., ING, Y.L., KIEFER, F., CHAN, J., ISCOVE, N., WOODGETT, J.R., ET LASSAM, N.J. 1996. MLK-3 activates the SAPK/JNK and p38/RK pathways via SEK1 and MKK3/6. *EMBO J.* 15: 7026-7035.

TSUNODA, S., SIERRALTA, J., ET ZUKER, C. 1998. Specificity in signaling pathways : assembly into multimolecular signaling complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8: 419-422.

VILLA, P., KAUFMANN, S.H., ET EARNSHAW, W.C. 1997. Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem. Sci.* 22: 388-393.

WAKSMAN, G., KOMINOS, D., ROBERTSON, S.C., PANT, N., BALTIMORE, D., BIRGE, R.B., COWBURN, D., HANAFUSA, H., MAYER, B.J., OVERDUIN, M., RESH, M.D., RIOS, C.B., SILVERMAN, L., ET KURIYAN, J. 1992. Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of *v-src* complexed with tyrosine-phosphorylated peptides. *Nature* 358: 646-653.

WESSEL, D., ET FLÛGGE, U.I. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergent and lipids. *Anal. Biochem.* 138: 141-143.

WESTERMANN, P., KNOBLICH, M., MAIER, O., LINDSCHAU, C., ET HALLER, H. 1996. Protein kinase C bound to the golgi apparatus supports the formation of constitutive transport vesicles. *Biochem. J.* 320: 651-658.

WHITMARSH, A.J., CAVANAGH, J., TOURNIER, C., YASUDA, J., ET DAVIS, R.J. 1998. A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science* 281: 1671-1674.

WHITMARSH, A.J., ET DAVIS, R.J. 1998. Structural organization of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem. Sci.* 23: 481-485.

WILKS, A.F., ET HARPUR, A.G. 1994. Cytokine signal transduction and the JAK family of protein tyrosine kinases. *BioEssays* 16: 313-320.

XIA, Z., DIECKENS, M., RAINGEAUD, J., DAVIS, R.J., ET GREENBERG, M.E. 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270: 1326-1331.

YARDEN, Y., ET ULLRICH, A. 1988. Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 57: 443-478.

ZIEMIECKI, A., HARPUR, A.G., ET WILKS, A.F. 1994. Jak protein tyrosine kinases : their role in cytokine signalling. *Trends Cell Biol.* 4: 207-212.